

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Zootaxonómia, Állatökológia, Hidrobiológia Program

Aszalós Júlia Margit

**AZ OJOS DEL SALADO VULKÁN KÖRNYÉKI MAGASHEGYI
VIZES ÉLŐHELYEK EXTREMOFIL BAKTÉRIUMKÖZÖSSÉGEI**

Doktori értekezés

Témavezető:
Dr. Borsodi Andrea
habilitált docens

Doktori Iskola vezetője:
Dr. Erdei Anna
egyetemi tanár

Doktori program vezetője:
Dr. Török János
egyetemi tanár



Budapest, 2019

„Szól a kürt, ellibben a függöny,
amit most látsz, az tényleg van.
Kár, hogy mikor körbenéznél,
a szélben a mécsesed ellobban.”

(Kispál és a Borz)

Tartalomjegyzék

1	BEVEZETÉS	7
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1	A Száraz-Andok és hasonló magashegyi környezetek geográfiai jellemzése	8
2.1.1	A Puna de Atacama-fennsík	10
2.1.2	Periglaciális környezetek 5900 m tszf magasságon	12
2.1.3	Az Ojos del Salado kráterének környezete	14
2.2	Hegyi sivatagok vizes élőhelyeinek mikrobiális ökológiai jelentősége	17
2.2.1	Magashegyi sós tavak baktériumközösségei	21
2.2.2	Permafroszt olvadéktavak baktériumközösségei	23
2.2.3	Glacio-vulkanikus környezetek baktériumközösségei	26
3	CÉLKITŰZÉSEK	29
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
4.1	A mintavételi helyek bemutatása	30
4.1.1	A Puna de Atacama-fennsík két magashegyi sós tava	30
4.1.2	Egy permafroszt degradációval keletkező olvadéktó	31
4.1.3	Az Ojos del Salado vulkán krátere	32
4.2	Mintavétel	33
4.3	Tenyésztéses vizsgálatok	35
4.3.1	Minták szélesztése, alkalmazott táptalajok	35
4.3.2	Csíraszámbecslés	36
4.3.3	DNS kivonás és polimeráz láncreakció (PCR) baktériumtörzsekből	36
4.3.4	Baktériumtörzsek csoportosítása ARDRA módszerrel	37
4.3.5	Baktériumtörzsek ökológiai toleranciájának meghatározása	38
4.4	A közösségi DNS kivonása	39
4.5	Denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE)	39
4.6	Újgenerációs DNS amplikon-szekvenálás	41
4.6.1	Ion Torrent szekvenálás	41
4.6.2	Illumina MiSeq szekvenálás	42
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	44
5.1	Baktériumközösségek diverzitása a Laguna Santa Rosa és Laguna Verde tavakban	44
5.1.1	A tavak vizének fizikai és kémiai paraméterei	44
5.1.2	A tavi üledék és bevonatminták tenyésztéses vizsgálatának eredményei	45
5.1.3	A sós tavakból tenyésztésbe vont baktériumtörzsek NaCl toleranciája	48
5.1.4	A sós tavakból származó minták DGGE vizsgálatának eredménye	50
5.1.5	A sós tavak baktériumközösségeinek összetétele újgenerációs DNS szekvenálással	51
5.1.6	A sós tavak baktériumközösségeinek összevetése hasonló élőhelyek diverzitásával	56
5.1.7	A sós tavak baktériumközösségeinek potenciális anyagcsere diverzitása	58
5.2	Baktériumközösségek diverzitása az Ojos del Salado olvadéktavának környezetében	62
5.2.1	Az olvadéktó vizének fizikai és kémiai paraméterei	62

5.2.2	Az olvadéktavi üledékminták tenyésztéses vizsgálatának eredménye	62
5.2.3	Az olvadéktóból tenyésztésbe vont baktériumtörzsek pH toleranciája	66
5.2.4	Az olvadéktóból származó minták DGGE vizsgálatának eredményei	67
5.2.5	Az olvadéktó baktériumközösségeinek összetétele újgenerációs DNS szekvenálással	68
5.2.6	Az olvadéktó baktériumközösségeinek összevetése hasonló élőhelyek diverzitásával	73
5.2.7	Az olvadéktó baktériumközösségeinek potenciális anyagcsere diverzitása	77
5.3	Baktériumközösségek diverzitása az Ojos del Salado kráterének környezeteiben	78
5.3.1	A vizsgált környezetek fizikai-kémiai paraméterei	78
5.3.2	A kráterkörnyezet tenyésztéses vizsgálatának eredményei	79
5.3.3	A kráterkörnyezetből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek pH toleranciája	81
5.3.4	A kráterkörnyezet baktériumközösségeinek összetétele újgenerációs DNS szekvenálással	82
5.3.5	A kráterkörnyezet baktériumközösségeinek összevetése hasonló élőhelyek diverzitásával	86
5.3.6	A fumarolás patak baktériumközösségeinek potenciális anyagcsere diverzitása	87
6	KÖVETKEZTETÉSEK	90
7	ÖSSZEFOGLALÁS	97
8	ABSTRACT	99
9	IRODALOMJEGYZÉK	101
10	ÁBRAJEGYZÉK	118
11	TÁBLÁZATJEGYZÉK	120
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	121

1 Bevezetés

A Földön számos olyan különleges élőhely található, melyeket sokáig az élet számára alkalmatlannak véltek. Az elmúlt néhány évtized kutatásainak köszönhetően több elmélet dőlt meg azzal kapcsolatban, hogy milyen szélsőséges környezeti paraméterekhez képesek élő szervezetek adaptálódni. Korábban teljesen élettelennek vélt területeken, mint például az Atacama-sivatagban, állandóan fagypont alatti hőmérséklettel jellemezhető permafroszt talajokban vagy extrém savas vizes élőhelyeken nem csak megtalálták az élet nyomait, de aktív anyagcserét folytató mikroorganizmusokat is kimutattak.

Az ún. extrémofil prokarióták (olyan Archaea vagy Bacteria doménbe tartozó mikroorganizmusok, melyek valamilyen szélsőséges környezeti paraméter jelenlétében mutatnak optimális növekedést) filogenetikai és anyagcsere diverzitásának vizsgálata számos kérdésre adhat választ. Az extrém környezetekre jellemző biodiverzitás vizsgálatával olyan ökológiai kérdésekre kaphatunk választ, mint például az extrémofil szervezetek szerepe a Föld biogeokémiai körforgásában. Közelebb kerülhetünk a földi élet korai történetének feltárásához is, hiszen az élet kialakulását is extrém környezetekben valószínűsítik. Vizsgálatukkal a mikroorganizmusok kolonizációs képességeit is feltérképezhetjük, ami asztrobiológiai jelentőséggel is bír. Az extrémofil szervezetek élőhelyi adaptációja és evolúciója eredményeképpen kialakult szokatlan anyagcsere folyamatokban résztvevő molekuláknak vagy anyagcsere termékeknek már eddig is számos humán alkalmazása ismert. Napjainkban az érdeklődés fókuszában azok a mikroorganizmusok állnak, melyek egyszerre akár többféle szélsőséges környezeti paraméterhez képesek alkalmazkodni.

Vizsgálatunk középpontjában a Száraz-Andok magashegyi tavai álltak, ahol a hegyi sivatagi klíma hatásai mellett a vulkáni kísérőjelenségek is szélsőséges környezeteket hoztak létre. A Puna de Atacama-fennsík sós két sós tavának (Laguna Santa Rosa és Laguna Verde) üledékében és mikrobiális bevonataiban élő baktériumközösségek diverzitását korábban sem tenyésztési módszerekkel, sem újgenerációs szekvenálással nem vizsgálták, hasonlóan a Föld legmagasabb vulkánja, az Ojos del Salado permafroszt olvadáktavainak (5900 m), illetve krátertavának (6480 m) környezetében előforduló közösségekhez. Jelen dolgozat célja ezen vizes élőhelyek baktériumközösségeinek feltárása volt tenyésztési és molekuláris biológiai módszerekkel.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A Száraz-Andok és hasonló magashegyi környezetek geográfiai jellemzése

Az Andok középső részén mintegy 1500 km hosszan húzódnak a Száraz-Andok vonulatai, ami a Föld legszárazabb magashegyi régiója. Itt található az átlagosan 3500 méterrel a tengerszint felett fekvő Puna de Atacama-fennsík, mely bolygónk legmagasabban fekvő sivataga. Területén számos 6000 méternél magasabban fekvő vulkán, köztük a Föld legmagasabb aktív tűzhányója, az Ojos del Salado (6893 m, D 27°06'34.6", Ny 68°32'32.1") emelkedik (Baker és mtsai, 1987). A vulkán (1. ábra) aktivitását jelzi, hogy környezetében napjainkban is több helyen találunk hévforrásokat és fumarolákat. A területen az éves csapadékmennyiség nem haladja meg a 150 mm-t, az éghajlati hóhatár pedig itt a legmagasabb a Földön (7000 m), amit az állandó jégtakaró nélküli hegycsúcsok is jeleznek (Mari és mtsai, 2014). A rendkívüli szárazságnak köszönhetően még a legmagasabb területeken sem jellemző a gleccserek jelenléte (Vuille és Ammann, 1997). Ez az egyik legkülönlegesebb élőhely bolygónkon, a szárazság mellett az alacsony átlaghőmérsékletnek köszönhetően 5600 m felett permafroszt (örökfagy, olyan talaj vagy üledék, ami legalább két egymást követő éven át 0 °C vagy annál alacsonyabb hőmérsékletű, Dobinski, 2011) jelenléte figyelhető meg (Nagy és mtsai, 2018). A nagy tengerszint feletti magasság miatt intenzív UV sugárzás is jellemző.



1. ábra Az Ojos del Salado látképe a Puna de Atacama-fennsíkról
(fotó: <http://www.andeshandbook.org/>)

A Száraz-Andok hiperarid, hegyi sivatagi klímáját ugyanazok a tényezők alakították ki, melyek révén bolygónk legidősebb és legszárazabb sivataga, az Atacama-

sivatag is létrejött. A régióban a Csendes-óceán irányából érkező nyugati szél dominál, azonban az Antarktiszból felől érkező hideg Humboldt-tengeráramlat hatása miatt ez a levegő nem szállít számottevő mennyiségű nedvességet. A keleti irányból, a nyári hónapok során érkező meleg és nedves szelek csapadékmennyisége a kontinensen nyugat felé haladva fokozatosan csökken, végül az Andok keleti láncain csapódik le (Garreaud, 2009).

A Száraz-Andok területén a magassággal párhuzamosan az éves átlagos csapadékmennyiség is nő, a sivatagi jelleg azonban egészen kb. 6200 m tszf magasságig megmarad (Vuille és Ammann, 1997). Ezen a magasságon az átlagos éves csapadékmennyiség már eléri a 150 mm-t. A hó formájában akár heti rendszerességgel érkező csapadék egésze azonban nem járul hozzá a terület víztartalmának növekedéséhez, ugyanis a rendkívül száraz levegőnek köszönhetően a leeső hó nagy része elszublimál (Nagy és mtsai, 2014a). Az alacsony átlaghőmérsékletnek köszönhetően (mely az Ojos del Salado csúcsán $-17,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, és csak ritkán emelkedik fagypont fölé) a terület víztartalmának jelentős része jég formájában, a permafroszt üledékben található: 5600 m tszf magasságon foltos, 5800 m tszf felett pedig folytonos permafroszt jellemző (Nagy és mtsai, 2018).

A sivatagi klíma hatása a nagy napi hőingásban is tetten érhető. Hóborítás nélkül a felszíni hőmérséklet akár $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ között változhat, ami az aprózódás révén aktívan formálja a tájat (Nagy és mtsai, 2014b). A kőszivatagban az extrém mértékű napi hőingáson kívül a rendkívül erős szél (szélmarta sziklák, kőtörmelékes hullámfodrok) munkája is meglátszik. A magashegyi periglaciális környezetben az egykori gleccserek maradványjégének fokozatos visszahúzódása révén termokarszt formák figyelhetők meg, a permafroszt degradációja során az aktív rétegből származó olvadékvíz felgyűlése pedig sekély víztesteket hoz létre (Nagy és mtsai, 2014a, Mari és mtsai, 2014). A szárazság hatására a hótakaró szublimációjával alakulnak ki a Dél-Amerikában kifejezetten a Száraz-Andokra jellemző jellegzetes formák, a penitenteszek, más néven csonthótűk (Mari és mtsai, 2014).

Az Ojos del Salado vulkán a dél-amerikai Száraz Átló déli peremén helyezkedik el, ami a klímaváltozás hatására északra tolódhat, így a területen a felmelegedés hatásai gyorsabb átalakulást fognak eredményezni (Azócar és Brenning, 2010). A klímaváltozás hatásainak vizsgálata mellett a terület asztrobiológiai jelentőséggel is bír (Cabrol és mtsai, 2009a). A Száraz-Andok régóta ismert Mars-analóg terület, ahol számos asztrobiológiai kutatást végeztek, a legmagasabban (5000 m felett) fekvő területeket az elmúlt években kezdték el kutatni (Schmidt és mtsai, 2018). Mivel naprendszerünk legtöbb bolygója és holdja (a Naptól való távolságuknak köszönhetően) kriogén típusú, a hideg és száraz

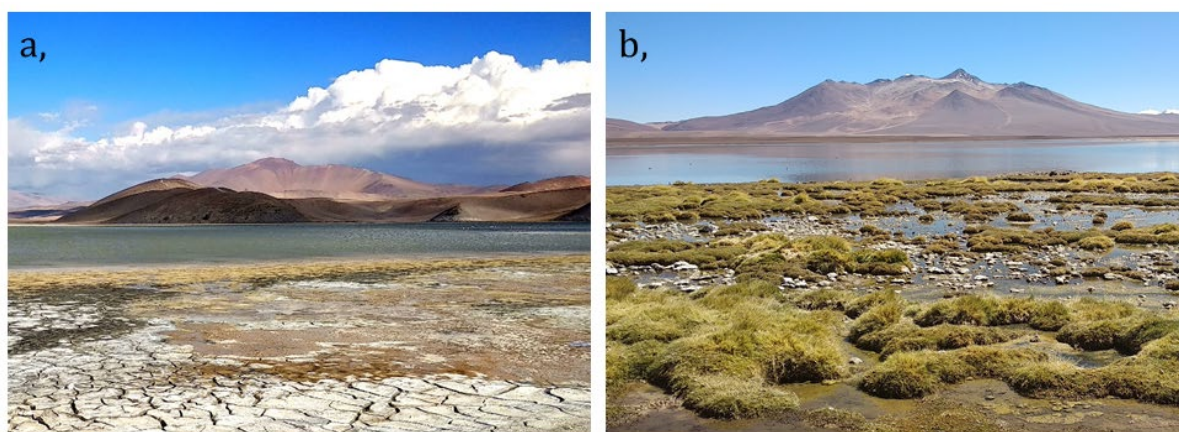
élőhelyek relevánsak asztrobiológiai kutatásokban (Gilichinsky, 2002). A permafrosztban található szervezetek felhasználhatók a földönkívüli élet kutatásában, például permafroszt környezetből származó tenyésztethető baktériumokat alkalmazhatunk biomarkerként a marsi élet lehetséges jeleinek kutatásakor (Gilichinsky, 2002, Vishnivetskaya és mtsai, 2006).

2.1.1 A Puna de Atacama-fennsík

Az Andok geológiájának köszönhetően Chile északi részén több, nagy kiterjedésű lefolyástalan terület is kialakult, ezek közé tartozik a Puna de Atacama-fennsík (Figueroa és mtsai, 2016). Az Andokban a magashegyi sztyeppén kialakuló vizes élőhelyek általában legalább 3000 m tszf magasságon helyezkednek el, amit befolyásol a környezet klímája is. Nagy napi hőingás jellemző (pl. éjjeli $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ és nappali $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ télen, éjjeli $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ és nappali $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nyáron), az Atacama-sivatag közelsége miatt pedig fokozott a szárazság, az átlagos éves csapadékmennyiség kb. 120 mm, míg a párolgás mértéke kb. 1000 mm/év (Rundel és Kleier, 2014). A Chile északi részén jellemző negatív vízmérleg miatt a sósivatagok (ún. salarok) jelenléte is gyakori, a vizes élőhelyek pedig lokális kivételt képeznek a száraz vidék azon helyein, ahol a medencékben összegyűlő vizek mennyisége meghaladja a párolgás mértékét (Figueroa és mtsai, 2016). A Puna de Atacama-fennsík sós síkságain és a vizes élőhelyek üledékében az elsődleges ionok a szulfátok, kloridok és borátok, ritkábban karbonátok, ez utóbbiak általában nátriumos, kalciumos vagy magnéziumos karbonátok (Hiner, 2009). A vulkánok közelsége miatt a feltörő termálvizek szokatlan sókkal (pl. borátok, lítium vagy káliumklorid) járulnak hozzá a vizek kémiai összetételéhez (Figueroa és mtsai, 2016).

Az ilyen magasföldeken glaciális, tektonikus és vulkáni eredetű, édes- vagy sós vizű tavak egyaránt megtalálhatók, csakúgy, mint a terület vulkáni jellege miatt megjelenő meleg források vagy gejzírek (Figueroa és mtsai, 2016). A fennsík vizes élőhelyeinek vízutánpótlását főként a hóolvadékból, csapadékból származó talajvíz adja (Squeo és mtsai, 2006). A Puna de Atacama-fennsík több szempontból is különleges terület: a már említett szárazság, és nagy hőingás mellett a nagy tengerszint feletti magasság miatt a tengerszinten mérhetőnél erősebb UV sugárzás jellemző. Ezek a magashegyi vizes élőhelyek biogeográfiai elszigetelt területek, ahol számos endemikus faj előfordulása jellemző az egyébként a szélsőséges környezetnek köszönhetően kevésbé diverz közösségekben (Figueroa és mtsai, 2016).

A Puna de Atacama-fennsíkon egy zárt medencében található a Laguna Santa Rosa, ami a Maricunga-sósivatag déli peremén fekvő sekély magashegyi sós tó, mely a Laguna del Negro Franciscoval együtt a Ramsari Egyezmény hatálya alá tartozik (Rundel és Kleier, 2014, 2. ábra). A 3770 m tszf magasságon fekvő tó közvetlen közelében sűrű, főként szittyófélék (Juncaceae) által dominált növénytakaró található, azonban a víztől néhány száz méterre távolodva ez megszűnik, és helyét a kopár magashegyi sivatag váltja fel. A diverzitás „hotspot” mintegy 49 állatfajnak ad otthont (41 madár és 8 emlősfaj), melyek több, mint 30%-a védett (Rundel és Kleier, 2014). A területen őshonos többek között a Chilében előforduló mindhárom flamingófaj (*Phoenicopterus chilensis*, *Phoenicopterus andinus*, *Phoenicoparrus jamesi*), csakúgy, mint a puma (*Felix concolor*), a culpeo pamparóka (*Pseudalopex culpaeus*), a vikunya (*Vicugna vicugna*) és a guanakó (*Lama guanicoe*).



2. ábra A Ramsari Egyezmény hatálya alá tartozó sós tavak, a Laguna Santa Rosa (a) és a Laguna del Negro Francisco (b)

A Laguna Santa Rosától keletre, a chilei-argentin határ közelében található a Laguna Verde, 4350 m tszf magasságon. Ebben a magasságban már nincs diverz növényzet a tópart mentén, azonban edényes növényeket a régióban szórványosan 4600 m tszf-ig találunk (Halloy, 1991). A Laguna Verde tó körül számos melegvizes forrás fakad, melyek sekély medencéken keresztül érik el a tó vizét, a medencékben pedig sok helyen a hipersós környezethez alkalmazkodott, szabad szemmel is látható, színes mikrobiális bevonat alakult ki. A víz sókoncentrációja (6250 $\mu\text{S}/\text{cm}$) meghaladja a Laguna Santa Rosa vizére jellemző értéket (5000 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Mindkét környezetben (feltehetően a terület vulkáni jellegének hatására megjelenő) lítiumot is kimutattak (Hiner, 2009).

Világszerte a szárazföldi állóvizek közel 45%-át alkotják sós tavak (Jiang és mtsai, 2007). A Puna de Atacama-fennsíktól északabbra fekvő hegyi sivatag, az Altiplano területén számos sós tó ismert. Ilyen a Salar de Atacama területén található Laguna Tebenquiche és Laguna La Brava, ami a több, mint 900 m vastag sókéreg alkotta sivatag közepén fekszik (Fariás és mtsai, 2013, Fernandez és mtsai, 2016). A Licancabur vulkántól északkeletre, a bolíviai Altiplano területén 4340 m tszf magasságon található két sós vízü tó, a Laguna Verde és Laguna Blanca, melyek főként meleg és hideg vízü forrásokból táplálkoznak (Cabrol és mtsai, 2009a). Sós tavakról beszámoltak Argentínában is (pl. Laguna Vilama és Laguna Azul, 4400 m tszf; Dib és mtsai, 2008), a perui Andokban pedig a 3800 m tszf magasságon fekvő Maras sólepárló több, mint 3000 medencéje lehet példa az antropogén hatásra kialakított sós vizes élőhelyekre (Maturrano és mtsai, 2006).

Hasonló vizes élőhelyek előfordulnak a Föld legnagyobb magashegyi fennsíkján, a Tibeti-fennsíkon is. A Kína nyugati részén elterülő, átlagosan 4500 m tszf magasságú fennsík összterülete több, mint 2 millió km². Az endorheikus területen, melynek 67%-ára permafroszt jelenléte jellemző, több ezer, különböző sókoncentrációjú, gyakran alkalikus tó található (Xiong és mtsai, 2012). Mivel a területen a tavak sókoncentrációja a déltől észak felé csökkenő csapadékmennyiséget követve az édestől a hipersósig terjedő gradienst mutat, valamint a tavak felszíne és mélysége is változatos, így a fennsík ideális természetes laboratórium a magashegyi vizes élőhelyek tanulmányozásához (Wu és mtsai, 2006). A legismertebb tavak közé tartozik a Chaka-tó, melynek üledékére a közel édesvízitől (0,02%) a hipersósig (32,5%) terjedő szalinitás gradiens jellemző (Jiang és mtsai, 2007). A fennsík tavainak vizsgálatával kimutatták, hogy a klímaváltozás permafrosztra gyakorolt hatása nagy mértékben befolyásolja a tavak méretét (Liu és mtsai, 2009a).

2.1.2 Periglaciális környezetek 5900 m tszf magasságon

A Földön a permafroszt a szárazföldek kb. 26%-án van jelen, a poláris régiókon kívül számos magashegységben is megtalálható (Steven és mtsai, 2006). A napi hőingás következtében a permafroszt legfelső, ún. aktív rétege átmeneti jelleggel különböző mélységig rendszeresen felenged, míg az alatta található permafroszt tábla folyamatosan fagyott állapotban van (Dobinski, 2011).

Az elmúlt évtizedek klímaváltozása következtében több régióban is a permafroszt gyors degradációja indult meg (Yang és mtsai, 2010). Az Ojos del Salado vulkánon 5900 m tszf magasságban, több permafroszt olvadéktó jelenlétéről is beszámoltak (Nagy és mtsai, 2014a, 3. ábra).

Az Ojos del Salado permafroszt olvadéktavai a klímaváltozásnak fokozottan kitett területen jelzik a felmelegedést, valamint ennek következtében jelentkező permafroszt degradációt (Nagy és mtsai, 2018). A vulkán jégtartalma fokozatosan átalakul: az egykori gleccserek eltemetett maradványjege és az örökfagy olvadása lesz a domináns folyamat, ami ahhoz vezet, hogy a felszín alatti jég olvadásnak indul, a folyamatosan lefelé szivárgó olvadékvíz pedig a lefolyástalan medencékben megreked, és sekély tavakat hoz létre (Nagy és mtsai, 2014b). A felmelegedésnek kitett területeken a permafroszt aktív rétegének egyre mélyebb kiterjedése jellemző (Laurion és mtsai, 2010). Bár a folyamat során kezdetben átmeneti nedvesedést eredményezve megnő a felszíni és felszín alatti vízáramlás, hosszabb távon fokozott szárazodás várható, a permafroszt fokozódó mértékű degradációja vízutánpótlás hiányában a tavak eltűnéséhez vezethet (Nagy és mtsai, 2014b).



3. ábra Az Ojos del Salado vulkánon 5900 m tszf magasságban található olvadéktó és környezete

A permafroszt degradációját más régiókban is leírták. Magashegyi területek közül a Száraz-Andokon kívül a jelenséget a Tibeti-fennsíkon is vizsgálták, ahol a permafroszt alsó határa 40-80 m-el emelkedett az utóbbi években (Shaoling és mtsai, 2000), illetve az Alpokban, a Monte Rosa csoportban is (Fischer és mtsai, 2006). A permafroszt degradációjáról beszámoltak sarkkörüli területeken is, ahol az aktív réteg évszakos dinamikája a klímaváltozás egyik legfontosabb indikátora (Bockheim és mtsai, 2013). Az

Antarktiszi-félszigeten, ami a kontinensen leginkább ki van téve a klímaváltozásnak, 3,4 °C-ot emelkedett a levegő éves átlaghőmérséklete, ami a permafroszt degradációjára utaló aktív réteg egyre mélyebb kiterjedését okozza (Bockheim és mtsai, 2013). Az Antarktiszi száraz területei számos környezeti tényező szempontjából (pl. alacsony átlaghőmérséklet, permafroszt jelenléte, alacsony vízaktivitás, erős UV sugárzás, alacsony szerves anyag tartalom) hasonlítanak a Száraz-Andok magashegyi sivatagára. A legismertebb ilyen régióban, az antarktiszi Száraz-völgyek területén számos kutatást végeztek (Cary és mtsai, 2010), csakhogy, mint a tenger felől könnyebben megközelíthető Déli-Shetland szigeteken (Bendia és mtsai, 2018).

Az Északi-sarkkör esetében részletesen vizsgálták az alaszakai és kanadai Arktiszi permafrosztjának állapotát. A kanadai szubarktikus területeken Laurion és mtsai (2010) permafroszt olvadéktavak kialakulásának hatásait elemezték. Kimutatták, hogy az oladás hatására a permafroszt szerves szén raktára mobilizálódik, a mikrobák számára újra elérhetővé válik, ami fokozott üvegház hatású gázok (pl. CO₂, CH₄) kibocsátását eredményezi. A folyamat a permafroszt területek nagy arányát figyelembe véve jelentős hatással lehet a globális szénkörforgalomra is (Laurion és mtsai, 2010).

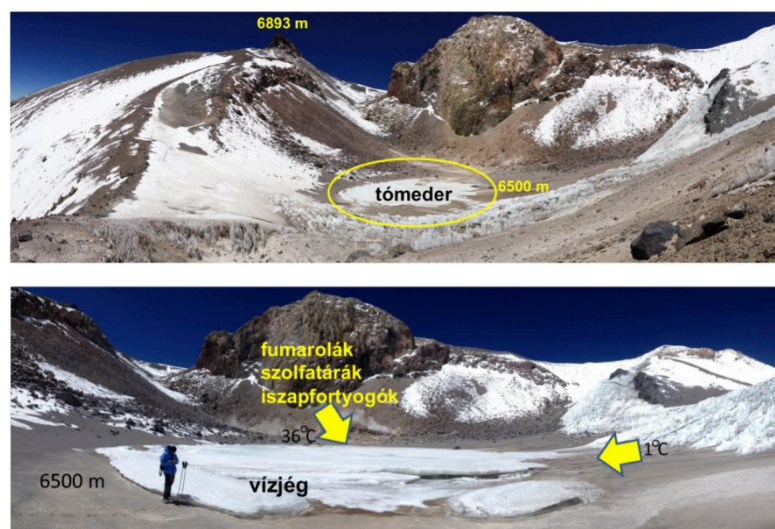
Bár az 5000 m tszf található permafroszt olvadéktavak nagyon ritkák, más periglaciális tavakat (pl morénatavakat, sarkkörüi tavakat) számos régióban ismerünk. Magashegyi területeken előfordulnak periglaciális tavak például a Himalájában (pl. Rongbuk gleccser morénatavai, 5100 m felett, Liu és mtsai, 2009b). Az Antarktiszon több száz tó ismert, melyek között vannak permafroszt területen elhelyezkedő sekély tavak is, ilyenek például a Száraz-völgyek tavai (Laybourn-Parry és Pierce, 2007).

Különböző termokarszt formákat nem csak a Földön, de a Marson is ismerünk. Ezek jelenléte arra utal, hogy a közelmúltban is keletkeztek tavak a bolygón, ami nagy asztrobiológiai jelentőséget kölcsönöz a szélsőséges hegyi sivatagi klímában található permafroszt olvadéktavaknak. Néhány potenciális Mars-analóg tavat már ismerünk a Földön, ilyen például az Imuruk-tó, mely egy alaszakai vulkáni területen található (Prieto-Ballesteros és mtsai, 2006).

2.1.3 Az Ojos del Salado kráterének környezete

Az Ojos del Salado csúcsától délre, 6480 m magasságon fekszik az a mellékkráter, ahol a Föld legmagasabban fekvő tava található (4. ábra). A tó környezetében forró gőzkitörések, fumarolák jelzik a vulkáni működést. A fumarolákból kiáramló meleg víz

(>40,5 °C) egy sekély patakot létrehozva folyik a tóba, melyet a patakon kívül a permafroszt, valamint a csapadékként érkező hó olvadékvize is táplál. Bár célzott kutatási eredmények hiányában pontos adataink nincsenek, az elmúlt évek expedíciói alapján valószínűsíthető, hogy a tó vize az év nagy részében fagyott állapotban van. Erre utal, hogy 2014 februárjában a tómederben nem volt nyílt vízfelület csak a teljes mértékben fagyott jéglepeny. Ugyanakkor 2016 februárjában nagy területű nyílt víz volt megfigyelhető ugyanezen a helyen (Nagy és mtsai, 2018).



4. ábra A Föld legmagasabban fekvő tómedencéje

Az Ojos del Salado mellékkráterében, 6480 m tszf magasságon fekvő tó vizének utánpótlását a kráterben működő aktív fumarolák, valamint az olvadó firn és hó adja
(Fotó és ábra: Nagy és mtsai, 2014a)

A nagy tengerszint feletti magasság és speciális klíma, valamint a permafroszt jelenléte miatt alapvetően különleges környezetnek tekinthető egy ilyen víztest, a jelen lévő vulkáni kísérőjelenségek pedig szintén hatással vannak a környezet extremitására. A fumarolákból feltörő víz ugyanis savas kémhatású (pH 2,08), ami a tó vizének pH-ját is csökkenti (pH 4,88). Ilyen tengerszint feletti magasságon nem csak a savas, de a meleg víz jelenléte is ritka, ezért ez a kevésbé ismert és emberi hatásoktól elszigetelt környezet természetes laboratóriumnak tekinthető, ami alkalmas arra, hogy egyszerre vizsgáljuk a nagy tengerszint feletti magasság és a vulkáni működés környezeti (pl. savas pH) hatásait.

Bolygónkon kevés olyan környezet ismert, mely hasonlít az Ojos del Salado kráter tavára. Az aktív vulkánok krátereiben előforduló tavak változatos fizikai-kémiai paraméterekkel jellemezhetők, melyeket az alapkőzet, a vulkáni aktivitás (pl. fumarolák), valamint a terület geográfiai jellege egyaránt meghatároz (Mapelli és mtsai, 2015).

A Földön ritkák az olyan környezetek, ahol permafrosztos területeken vulkáni tevékenység miatt fumarolákat vagy melegvizet forrásokat találunk. A glacio-vulkanizmus jelensége Izlandon, Észak- és Dél-Amerikában, a Kamcsatka-félszigeten, valamint az Antarktiszon a leggyakoribb (Smellie és Edwards, 2016), így az Ojos del Salado kráteréhez hasonló környezeteket is ezeken a helyeken érdemes keresnünk.

Bár a Száraz-Andokban a terület vulkáni jellege miatt sok helyen fordulnak elő fumarolák és meleg források (lásd pl. Laguna Verde), jelenlétük a permafroszt határ (kb. 5600 m tszf) felett csak elvétve ismert. A Puna de Atacama régiójában ilyen magasságban az Ojos del Saladon és a Socompa vulkánon, északabbra pedig több, 6000 méternél magasabb vulkánon (pl. Parinacota, Guallatiri, Aucanquilcha, San Pedro) ismertek forró gőzkitörések (Francis és MacAllister, 1986). Számos krátertó is előfordul a területen, ilyenek például a Simba vulkán (5930 m) és Socompa vulkán (6060 m) tavai.

Az alacsonyabban fekvő területek közül elsősorban a poláris régiókban fordulnak elő hidrotermális rendszerek hideg környezetekben, az Északi-félteke sarkkörüli területein megtalálhatók Izlandon, a Kamcsatka-félszigeten, és Svalbardon is (Cousins és mtsai, 2018). A Déli-féltekén, az Antarktiszon a geotermális élőhelyek leggyakrabban az aktív vulkáni területeken fumarolák környezetében felmelegedett ásványi talajok formájában fordulnak elő (Herbold és mtsai, 2014). A legtöbb vulkán a kontinens keleti részén a Viktória-földön, nyugati részén a Marie Byrd-földön fordul elő, utóbbi régióban található az Antarktisz legmagasabb vulkánja, a Mount Sidley (4285 m) is. Mindössze négy antarktisi vulkán környezetében ismertek geotermikus élőhelyek (Herbold és mtsai, 2014). Míg a Mount Melbourne és a Mount Rittmann a Viktória-föld területén magasodik, a kontinens legaktívabb vulkánja, a Mount Erebus (3794 m), a Ross-szigeten található. Ez utóbbi a vulkáni működés hatására akár 60 °C-ra is felmelegedett ásványi üledékéről is ismert (Soo és mtsai, 2009). Az Antarktisi-félszigettől északra a Déli-Shetland-szigetek tagja a Deception-sziget, a negyedik olyan vulkán a kontinensen, mely geotermikus jellegéről ismert. A legutóbb 1969-ben aktív vulkán környezetében előforduló fumarolák és gleccserek közelségének köszönhetően jellegzetes hőmérsékleti gradiensek (0-98 °C) alakultak ki (Bendia és mtsai, 2018). Feltételezhető, hogy további geotermikus élőhelyek is előfordulnak a kontinens zordabb, elszigeteltebb vulkáni területein, melyek felfedezése még várat magára (Herbold és mtsai, 2014).

Csak kevés savas környezet ismert az Ojos del Salado kráteréhez hasonló magashegyi területen. A Costa Ricában található Poás vulkán krátertava, a Laguna Caliente, 2575 m tszf magasságon fekszik (Hynek és mtsai, 2018). A kráterben aktív

fumarolák működése révén jött létre az extrém savas kémhatás (pH -1-1,5). A tengerszinthez közelebb előforduló, természetes vagy mesterséges folyamatok révén létrejött savas vizek is ismertek, mint például a Yellowstone Nemzeti Park forrásai (USA, Macur és mtsai, 2004) vagy a spanyolországi Tinto folyó (Amils és mtsai, 2007).

A krátertőhöz hasonló hideg környezetekben található geotermális élőhelyek és a savas környezetek közül számos olyat ismerünk, melyek asztrobiológiai kutatások középpontjában állnak (pl. az antarktiszi Száraz-völgyek, a Poás vulkán tava, a Tinto folyó, és a Deception-sziget). A vulkán-jég kölcsönhatások által uralt szárazföldi területek, illetve a vasban gazdag savas környezetek egyaránt tekinthetők Mars-analóg területeknek, mivel nagy a valószínűsége annak, hogy a vulkanizmus és glaciáció egyszerre volt jelen a Marson (Squyres és mtsai, 1987). A vulkáni hidrotermális rendszerek (gyakran alacsony pH-val párosulva) reaktív környezetek, és egy permafroszttal kapcsolatban álló, magashegyi területen, ahol alacsony a szerves anyag koncentráció, Mars-analóggént relevánsnak tekinthetők, hiszen a Marson magas UV sugárzás, szárazság, alacsony hőmérséklet, vékony atmoszféra és oxidáló körülmények uralkodnak (Cousins és Crawford, 2011).

2.2 Hegyi sivatagok vizes élőhelyeinek mikrobiális ökológiai jelentősége

A magashegyi sivatagok vizes élőhelyei a nagy tengerszint feletti magasság és a klíma sajátosságainak köszönhetően extrém élőhelynek tekinthetők, ahol az alacsony produktivitással jellemezhető közösségek leegyszerűsödött táplálékhálózatot alkotnak. A mikroorganizmusok közösségeinek taxon-diverzitását és az egyes fajok abundanciáját a tengerszint feletti magasság, a hőmérséklet, valamint a sókoncentráció egyaránt befolyásolja. Az alacsonyabb tengerszint feletti magasságon fekvő tavakhoz képest viszont enyhébb hatással van a diverzitásra a vízgyűjtő terület jellege, hiszen a magashegyi tavak vízgyűjtő területe általában viszonylag kisebb és számottevő növényzet sem fordul elő rajta, így kevésbé befolyásolja a tóba érkező szerves anyag mennyiségét.

Ilyen szélsőséges körülmények között extremofil mikroorganizmusok jelenléte valószínűsíthető. Az extremofil szervezetek legnagyobb arányban a baktériumok és ősbaktériumok közül kerülnek ki.

Halofil („só-kedvelő”) szervezetek az élet mindhárom doménjében (Bacteria, Archaea, Eukarya) előfordulnak. A Bacteria doménben polifiletikus csoportot képeznek, számos halofil baktérium közeli rokonai között találunk nem-halofil szervezeteket.

Legnagyobb arányban a Proteobacteria, a Cyanobacteria, a Firmicutes, az Actinobacteria, a Spirochaetes és a Bacteroidetes törzsekben fordulnak elő (Oren, 2008). A prokarióták között a környezet magas sókoncentrációjához való alkalmazkodásnak alapvetően két formája ismert. A sós környezetben anyagcseréjük fenntartásához (a sejten belüli víz és turgor megtartása érdekében) a környezetével legalább megegyező ozmotikus koncentrációra van szükség. A legtöbb halofil baktérium ezért általában kis molekulású szerves anyagokat (ún. kompatibilis oldott anyagokat) szintetizál vagy vesz fel a környezetéből és akkumulál sejtjében. Ezek segítségével a felesleges só kizárják a sejteikből (fenntartva a megfelelő ozmotikus koncentrációt) úgy, hogy közben nem gátolják az enzimműködéseket. Ennek az adaptációs mechanizmusnak a hátránya, hogy a kompatibilis oldott anyagok előállítása költséges, így sós környezetben bizonyos, alacsony energiamérlegű anyagcserét nem éri meg folytatni (Oren, 2002). Az alacsony vízáktivitás ellensúlyozására a másik lehetséges stratégia a kálium és klorid ionok felhalmozása a sejtben. Ez a stratégia a teljes proteom magas sókoncentrációhoz való adaptációját igényli, ami hosszú evolúció eredményeként jöhet csak létre, így csak néhány csoport (pl. Halobacteriaceae család) esetében alakult ki (Oren, 2008).

A különleges élőhelyeken az alkalmazkodás egyik általános megjelenési formája a biofilmképzés, ami sós környezetekben is gyakori. Biofilmek változatos környezetekben fordulnak elő, különösen gyakoriak hidrotermális élőhelyeken. A biofilm képzés, főként a sejteket körülvevő EPS (extracelluláris polimer szubsztancia) miatt, védelmet adhat a benne előforduló mikroorganizmusoknak a különböző környezeti hatások pl. az UV sugárzás, a magas sókoncentráció vagy kiszáradás, a magas hőmérséklet, a nehézfémek, illetve a savas kémhatással szemben (Hall-Stoodley és mtsai, 2004).

A halofil baktériumok anyagcsere diverzitása széles skálán mozog: fototrófok, aerob heterotrófok, fermentálók, denitrifikálók, szulfát-redukálók és metanogének egyaránt előfordulnak közöttük (Oren, 2002).

Mivel a Földi bioszféra nagy része (kb. 80%-a) tartósan 5 °C alatti hőmérsékleten él, a hideg-adaptált mikroorganizmusok széles körben elterjedtek és meglehetősen változatos csoportot képeznek (Margarin és Schinner, 1994). A hideg-adaptált szervezetek két csoportra különíthetők. Azokat nevezzük obligát pszichrofil (hidegkedvelő, valódi pszichrofil) mikroorganizmusnak, melyek képesek 0 °C vagy az alatti hőmérsékleten is növekedni, azonban nem képesek anyagcserét folytatni 20 °C felett. A pszichrotrof (hidegtűrő) szervezetek ezzel szemben képesek 20 °C-nál magasabb hőmérsékleten is növekedni, de akár 0 °C körüli hőmérsékleten is folytatnak anyagcserét (Morita, 1975).

Pszichrofil és pszichrotróf mikroorganizmusok előfordulnak tengerekben, poláris régiókban, magashegyi területeken, gleccsereken, permafrosztban, de időszakosan hideg környezetekben is, például mérés-keltői tavakban és talajokban, hűtött élelmiszerekben egyaránt (Margesin és Schinner, 1994).

Pszichrofil szervezetek előfordulnak a Bacteria, az Archaea (pl. *Methanogenium*, *Halorubrum* fajok) és Eukarya (pl. *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Candida*, *Chloromonas* fajok) doménben egyaránt (Feller és Gerday, 2003). A baktériumok között nagy filogenetikai diverzitás jellemző rájuk, számos törzsben előfordulnak képviselőik. A pszichrofil baktériumok anyagcsere diverzitásukat tekintve is változatosak, ismertek köztük fototróf, heterotróf, kemolitotróf szervezetek egyaránt, így a krioszférában diverz közösségeket hozhatnak létre, ahol több trofikus szint is kialakulhat (Margesin és Miteva, 2011).

Az alacsony hőmérsékletre való alkalmazkodás során egy sor adaptációs mechanizmus teszi lehetővé a pszichrofil szervezetek fennmaradását. Az alacsony hőmérsékleten a megnövekedett rigiditás ellensúlyozására a sejtmembrán összetétele megváltozik: a membránban a telítetlen zsírsavak aránya megnő, így járulva hozzá a fluiditás megőrzéséhez (Feller és Gerday, 2003). A pszichrofil enzimek aminosavösszetétele úgy változik meg, hogy a fehérje alacsonyabb hőmérsékleten is megőrizze a megfelelő működéséhez szükséges mobilitást és flexibilitást. Ezáltal a pszichrofil baktériumok olyan alacsony hőmérsékleten is képesek anyagcserét folytatni, ahol a mezofil enzimek molekuláris mozgása (ezzel együtt működőképessége) csökken, vagy teljesen megszűnik (Feller és Gerday, 2003). Az alkalmazkodás további módjai között szerepel a különböző hideg-akklimatizációs fehérjék vagy hideg-sokk fehérjék termelése, melyek lehetővé teszik a fehérjék és nukleotidok megfelelő térszerkezetének kialakulását és megőrzését (Margesin és Miteva, 2011).

Azokat a szervezetek tekintjük acidofilnek, melyek növekedési optima pH 3 vagy az alatti (Johnson, 1998). Savas körülmények előfordulnak természetes környezetekben például vulkáni területeken, de kialakulhatnak emberi tevékenység nyomán is, például ércbányászat következményeként (Baker és Banfield, 2003). Az acidofilek képviselői a Bacteria és az Archaea doménben egyaránt elterjedtek, és széles anyagcsere diverzitás jellemzi őket. Feltételezések szerint a legősibb szervezetek is acidofil mikroorganizmusok voltak, így kutatásuknak evolúcióbíológiai jelentősége is van (Johnson, 1998). Többek között fontos szerepük van a vas és a kén biogeokémiai ciklusában, hiszen számos vasredukáló, vasoxidáló, szulfátredukáló, illetve kénoxidáló

szervezet tartozik az acidofil baktériumok közé (Baker-Austin és Dopson, 2007). A kemolitoautotróf *Acidithiobacillus ferrooxidans* például a vas és a kén oxidációjára egyaránt képes (Valdés és mtsai, 2008). Az alacsony pH-hoz való alkalmazkodás módja részleteiben még nem ismert. Adaptációjuk során a cél, hogy a megfelelő enzimműködéshez szükséges közel semleges pH-t képesek legyenek fenntartani a sejten belül. Emiatt a membrán protonok számára nehezen átjárható, amit Archaeákban (pl. *Ferroplasma* sp.) például a membránban tetraéter lipidek tesznek lehetővé (Baker-Austin és Dopson, 2007).

Az extremofil szervezetek szokatlan anyagcseretermékeik révén változatos alkalmazási lehetőségekkel bírnak, ami miatt nagy érdeklődésre tartanak számot (van den Burg, 2003). Egyes pszichrofil baktériumok enzimeit felhasználják detergensokban, sütőiparban, bioremediációban egyaránt (Cavicchioli, 2002, Feller és Gerday, 2003), a halofil baktériumok enzimeit mosószerekben, kompatibilis oldott anyagaikat (pl. ektoint) kozmetikumokban, a sejtekből kinyert bakteriorodopszint pedig optikai érzékelőkben alkalmazzák (Oren, 2010). Az acidofil baktériumoknak különleges metabolikus diverzitásuk miatt nagy jelentőségük van a biotechnológiában, és alkalmazzák őket bányászatban ércek kilúgzására (Sharma és mtsai, 2016) vagy veszélyes hulladékok, pl. akkumulátorok ártalmatlánítására (Heydarian és mtsai, 2018).

A különleges környezetek mikrobiális ökológiájának vizsgálatával evolúciós kérdésekre is választ kaphatunk, hiszen egyes feltételezések szerint az élet kialakulása is ilyen körülmények között ment végbe, az extremofil szervezeteknek és az élet peremfeltételeinek kutatása asztrobiológiai kérdésekre is választ adhat (Cavicchioli, 2002). A Földön található legextrémebb környezetek mikrobiológiai diverzitásának kutatása során megismerhetjük az élet peremfeltételeit, ezáltal behatárolhatóvá válik, hogy milyen fizikai-kémiai környezetben létezhet élet. Ilyen ismeretek birtokában pontosabb hipotéziseket állíthatunk fel arról, hogy milyen exobolygókon vagy exoholdakon érdemes az élő szervezetek nyomai után kutatni, és milyen biomarkerek jelzik ezek jelenlétét (Vishnivetskaya és mtsai, 2006, Cheng és mtsai, 2017). Az olyan szélsőséges környezetek, mint pl. az Atacama-sivatag, a marsi környezethez hasonlóan alacsony szerves anyag tartalommal rendelkeznek, így vizsgálatuk támpontot adhat a kutatási módszerek fejlesztéséhez is (Navarro-González és mtsai, 2003, Cabrol és mtsai, 2009a).

2.2.1 Magashegyi sós tavak baktériumközösségei

A szélsőséges környezeti tényezők ellenére az Andok sós tavaiban és vizes élőhelyein változatos baktériumközösségeket tártak fel mind a plankton, a bentosz, és különféle mikrobiológiai bevonatok vizsgálata során. Más sós és hipersós környezetekhez hasonlóan a magashegyi sós tavakban is alacsony a taxonómiai diverzitás, a baktériumközösségek összetétele elsősorban a sókoncentráció függvényében változik (Wu és mtsai, 2006, Jiang és mtsai, 2007). A vizek nagy sókoncentrációja a taxon-diverzitáson túl az anyagcsere diverzitásra is hatással van, a hiperszalin környezetben ugyanis bizonyos anyagcserefolyamatok energetikailag nem kifizetődőek (Oren, 2002). Az általában sekély sós tavak (<4 m) vizére és üledékére jellemző mikrobiológiai diverzitást tenyésztési és tenyésztéstől független módszerekkel (főként DGGE-vel, és 16S rRNS gén alapú klóntárakkal) egyaránt vizsgálták.

Általánosságban elmondható, hogy 16S rRNS gén alapú klóntárakkal a Proteobacteria és a Bacteroidetes törzsek képviselőit találták dominánsnak az Andok magashegyi tavaiban, mellettük pedig számos egyéb taxon (pl. Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Deinococcus-Thermus, Chloroflexi, Gemmatimonadetes) képviselőit mutatták ki, melyek kisebb relatív abundanciával fordultak elő (Albarracín és mtsai, 2015). A Laguna Tebenquiche vizében a DGGE és 16S rRNS gén alapú klóntárakkal feltárt baktériumközösségek térbeli és időbeli heterogenitásáról is beszámoltak, amit a változó sókoncentráció eredményének tulajdonítottak (Demergasso és mtsai, 2008). Cabrol és mtsai (2009b) egy átfogó kutatás keretében szintén DGGE módszerrel vizsgálta két, magashegyi sós tó, a Laguna Blanca és Laguna Verde (Bolívia) baktériumközösségeit. A Licancabur vulkán mellett fekvő vizes élőhelyeken a legnagyobb arányban béta- és gammaproteobaktériumok (pl. *Acidithiobacillus thiooxidans*) alkotta közösségeket tártak fel, és a tavak környezetében előforduló kovamoszatok diverzitását is vizsgálták.

Viszonylag kevés olyan tanulmány található, ahol nagy-áteresztőképességű újgenerációs szekvenálással vizsgáltak hasonló környezeteket. Aguilar és mtsai (2016) a Salar de Huasco (Chile, 3800 m tszf) vizes élőhelyeinek baktériumközösségeit tárta fel piroszekvenálással. A közösségek kis léptékű (<1 m) térbeli heterogenitását vizsgálták, valamint összehasonlították két közeli tó baktériumközösségeinek összetételét. Az alacsonyabb DOC tartalmú tóban a Proteobacteria és a Bacteroidetes törzsek nagy relatív abundanciával voltak jelen, a magasabb DOC tartalmú vízben azonban a Cyanobacteria

törzs képviselői voltak detektálhatóak legnagyobb arányban. Csak kevés OTU („operational taxonomic unit”) fordult elő mindkét környezetben, azonban a szekvenciák mintegy 47%-a ezidáig tenyésztésbe nem vont, korábban csak környezeti mintákból molekuláris módszerekkel kimutatott, ún. kandidátus baktériumfajba tartozott (Aguilar és mtsai, 2016). Farías és mtsai (2014) a Laguna Tebenquiche és a Laguna La Brava üledékhez kötött élőhelyeire (pl. mikrobiális bevonatokra, gipsz dómokra) jellemző baktériumközösségek vizsgálata során hasonló eredményre jutottak. A két tó mikrobiális bevonatában diverz közösségeket írtak le, melyekben a Proteobacteria, a Bacteroidetes, a Spirochaetes, a Chloroflexi, a Verrucomicrobia és a Planctomycetes mellett nagy arányban voltak jelen ezidáig tenyésztésbe nem vont filogenetikai törzsek képviselői. Fernandez és mtsai (2016) szintén piroszekvenálással vizsgálták a Laguna Tebenquiche extrém sós környezetét, például mikrobiális bevonatokat, rizómához kötött konkréciókat és evaporitok belsejét. Legnagyobb arányban az Archaea domén képviselőit (pl. *Thermoplasmata*) azonosították, de emellett diverz baktériumközösségeket is leírtak. A mikrobiális bevonatokban főként fototróf mikroorganizmusok (pl. Chromatiales, Cyanobacteria), mérsékelten halofil baktériumok (pl. *Psychrobacter*, *Halomonas*) és extrém halofil archaeák (pl. *Halorubrum*, *Haloferax*) jelenlétét mutatták ki (Fernandez és mtsai, 2016). A Föld legmagasabban fekvő sztratomolitjait is a Száraz-Andokban írták le: a 3570 m tszf felett, az argentin Andokban található Socompa-tó hipersós, arzénben gazdag, hidrotermális befolyók révén meleg (20-24 °C) környezetében a *Deinococcus-Thermus*, a Rhodobacteraceae, a Desulfobacterales és a Spirochaetes képviselői voltak dominánsak a sztratomolitokban, melyek kovamoszatokkal (*Amphora* sp.) együtt alkottak közösséget (Farías és mtsai, 2013).

Az Andok magashegyi sós tavainak vizéből, üledékéből, mikrobiális bevonataiból egyaránt végeztek tenyésztést is, ami lehetőséget adott arra, hogy a tenyésztethető baktériumok különböző környezeti paraméterekre adott toleranciáját vizsgálják. Ordoñez és mtsai (2009) hat különböző, 3400 és 4600 m tszf között fekvő, széles skálán változó sókoncentrációval jellemezhető tóból összesen 88 baktériumtörzset vontak tenyésztésbe, és kimutatták, hogy a sókoncentráció és az izolátumok pigmentáltsága nem függött össze az UV-B toleranciájukkal. A baktériumtörzsek változatos UV-B toleranciával rendelkeztek, a legellenállóbbak a proteobaktériumok közül kerültek ki. Dib és mtsai (2008) Argentínában két oligotróf magashegyi sós tó vizéből tenyésztett izolátumok UV-B, arzén és antibiotikum rezisztenciáját vizsgálták. Az Actinobacteria, a Firmicutes és a Proteobacteria törzsek képviselőit vonták tenyésztésbe, melyek között nem csak UV-B

sugárzásra rezisztens, valamint a környezetben kimutatható nehézfémekkel szembeni toleranciát mutató szervezeteket sikerült kimutatni, de arzén-toleranciával korreláló antibiotikum rezisztenciát is felfedeztek. Lara és mtsai (2012) a Salar de Atacama tavaiban az arzén toleráns szervezetek jelenlétét vizsgálták tenyésztési és molekuláris módszerekkel. Eredményeik alapján egy teljes arzén biogeokémiai ciklus meglétét feltételezték a vizsgált környezetekben, hiszen olyan szervezetek jelenlétét mutatták ki, melyek képesek az arzént redukálni, akkumulálni, valamint az arzén redukcióhoz szükséges elektrondonorokat (pl H_2 , H_2S , ecetsav) létrehozni.

A Száraz-Andok magashegyi tavaihoz hasonló sós vizes élőhelyek a Tibeti-fennsíkon is megtalálhatók. Számos tó baktériumközösségeit vizsgálták tenyésztési és molekuláris módszerekkel egyaránt. A fennsík hat tavában 16S rRNS gén alapú klóntárakkal a Bacteroidetes és a Cyanobacteria törzsek dominanciáját mutatták ki, valamint a tengerszint emelkedésével csökkenő filogenetikai diverzitást (Xing és mtsai, 2009). A baktériumközösségek diverzitását a sókoncentráció függvényében vizsgálták egyazon tó, a Chaka-tó üledékében (Jiang és mtsai, 2007), illetve egy átfogó vizsgálat keretében tizenhat különböző sókoncentrációval jellemezhető tó között is (Wu és mtsai, 2006). A Tibeti-fennsík sós tavainak 16S rRNS gén alapú klóntárakkal való vizsgálata során a legnagyobb relatív abundanciával kimutatott törzsek a Proteobacteria (Alpha- és Gammaproteobacteria, pl. *Marinobacter* sp), valamint a Bacteroidetes képviselői voltak (Wu és mtsai, 2006), míg újgenerációs szekvenálással nagyobb diverzitást, így az Acidobacteria, az Actinobacteria, a Chloroflexi, a Firmicutes, a Cyanobacteria, a Gemmatimonadetes és a Plancomycetes törzsekbe tartozó szekvenciákat is kimutattak (Yang és mtsai, 2016).

2.2.2 Permafroszt olvadáktavak baktériumközösségei

A permafroszt a szélsőséges körülmények ellenére (hosszan tartó fagypon alatti hőmérséklet, gyakran alacsony szerves anyag koncentrációval és magas gamma háttérsugárzással párosulva) egy állandó és stabil környezetnek tekinthető, mely az adott körülményekhez jól alkalmazkodott mikroorganizmusok viszonylag változatos közösségének ad otthont (Jansson és Tas, 2014). A permafroszt számos különleges niche-t biztosít a mikroorganizmusoknak (Gilichinsky, 2002), ezáltal nagymértékben eltérő baktériumközösségek alakulhatnak ki a permafroszt felső, ún. aktív rétegében, mely

rendszeres fagyási-olvasási ciklusoknak van kitéve, valamint a folyamatosan fagyott permafroszt tábla jegében és a két élőhely határfelületén (Jansson és Tas, 2014).

A permafroszt jelenléte által befolyásolt élőhelyek mikrobiológiai diverzitásának vizsgálata iránt az utóbbi néhány évtizedben nőtt meg az érdeklődés (Steven és mtsai, 2006). A klímaváltozás során végbemenő permafroszt degradáció a korábban jég által uralt örökfagyott szárazföldi területeket vizes élőhelyekké alakítja (Yang és mtsai, 2010). A permafroszt degradációja által a jelenlévő mikroorganizmus közösségek összetétele és aktivitása is megváltozik (Mackelprang és mtsai, 2011, Vincent és mtsai, 2010). A magashegyi permafroszt olvadáktavak olyan létező, de minden bizonnyal rövid életű élőhelyek, ahol az alacsony szerves anyag koncentráció miatt főként leegyszerűsödött baktériumközösségek fordulhatnak elő. Mivel ezek a tavak ritkák, így a mikrobiológiai diverzitásukról nincs részletes információ. Az alacsonyabb tengerszinten fekvő permafrosztos területek baktériumközösségeit viszont széles körben kutatták, tenyésztéses és molekuláris biológiai módszerekkel egyaránt. Mint sok más jég által befolyásolt környezetben, a permafrosztban is elsősorban pszichrofil és pszichrotrof szervezeteket írtak le, melyek általában jól alkalmazkodtak az oligotrof környezetekre jellemző alacsony szerves anyag koncentrációhoz, valamint a rendszeres kiszáradáshoz is (Jansson és Tas, 2014).

A poláris területeken (Alaszkában, Szibériában és az Antarktiszon) vizsgált permafrosztok esetében helyenként nagy mértékben eltérő taxon-diverzitást találtak molekuláris biológiai módszerekkel, ami a kutatásonként eltérő mintavételnek és feldolgozásnak tulajdonítható. A legtöbb vizsgált élőhelyen az Actinobacteria, a Bacteroidetes, a Firmicutes és a Proteobacteria törzsek képviselői voltak jelen a legnagyobb relatív abundanciával (Jansson és Tas, 2014). Az antarktiszi Száraz-Völgyek sarkkörüli sivatagának permafroszt talajaiban a tenyésztéses vizsgálatok során az *Arthrobacter*, a *Brevibacterium*, a *Corynebacterium*, a *Micrococcus*, a *Flavobacterium*, a *Nocardia*, a *Streptomyces* és a *Bacillus* nemzetségeket azonosították. Molekuláris módszerekkel a legnagyobb arányban az Actinobacteria, az Acidobacteria és a Bacteroidetes törzsek reprezentánsait mutatták ki, a közösségek összetétele pedig nagymértékben különbözött a jóval melegebb éghajlatú Antarktiszi-félsziget üledékében előforduló közösségekéétől (Cary és mtsai, 2010). Az eddigi kutatások alapján a Száraz-Völgyek baktériumai tényleges közösségeket alkotnak, igaz, olyan leegyszerűsödött trofikus hálózatban, ahol autotrof és heterotrof szervezetek egyaránt megtalálhatók (Cary és mtsai, 2010).

Wilhelm és mtsai (2011) a kanadai arktiszi területeken vizsgálták az aktív rétegre és a permafrosztra jellemző baktériumközösségek szerkezetét. Csíraszámbecsléssel az aktív rétegben közel százszoros tenyésztethető aerob telepszámot mutattak ki, mint a permafrosztban. A mérsékeltén savas (pH <5,0) és hideg környezetben főként pszichrotróf, halotoleráns és acidotoleráns szervezetek fordultak elő mindkét rétegben. A két környezet közötti különbség 16S rRNS gén alapú klontárakkal is kimutatható volt, főként az *Acidobacteria* és az *Actinobacteria* törzs jelenlétében mutatkozott meg, hiszen előbbi az aktív rétegben, utóbbi a permafrosztban volt domináns (Wilhelm és mtsai, 2011). Comte és mtsai (2016) szintén Kanadában, de a szubarktiszi területen, egy É-D-i gradiens mentén vizsgálták a klímaváltozás baktériumközösségekre gyakorolt hatását. Permafroszt olvadéktavak bakterioplanktonját vizsgálták piroszekvenálással, és az *Actinobacteria*, valamint a *Betaproteobacteria* dominanciáját találták. Biogeográfiai elemzésük alapján a nagy léptékű környezeti gradiensek (főként az éghajlat) vannak a legnagyobb hatással a baktériumközösségek összetételére (Comte és mtsai, 2016). Hultman és mtsai (2015) alaszakai termokarsztos tavak és permafroszt, valamint permafroszt aktív réteg baktériumközösségeit hasonlították össze mintegy modellezve a mikrobiológiai diverzitás permafroszt degradáció következtében bekövetkező változását. Metatranszkriptom elemzéssel kimutatták, hogy a permafroszt degradáció számos anyagcserefolyamatnak (pl. metán oxidáció) kedvez (Hultman és mtsai, 2015).

Magashegyi régiókban, például a Tibeti-fennsíkon is vizsgáltak permafrosztra jellemző baktériumközösségeket. Nagy tengerszint feletti magasságon a permafrosztra a *Proteobacteria* és az *Actinobacteria* mellett a *Patescibacteria* képviselőinek jelenléte is jellemző (Altshuler és mtsai, 2017). Zhang és mtsai (2007b) 4100-4800 m közötti tszf magasságokban vettek mintát, és tenyésztéssel három nemzetség (*Arthrobacter*, *Nesterenkonia* és *Citricoccus*) képviselőit mutatták ki. Bai és mtsai (2006) a Tien-San-hegységben, 3800 m tszf magasságban vizsgálták a permafroszt tenyésztethető diverzitását, és az *Arthrobacter*, a *Janthinobacterium*, a *Sphingomonas* és a *Psychrobacter* képviselőit azonosították.

A Száraz-Andokban kifejezetten permafrosztra vagy permafroszt olvadéktavakra jellemző baktériumközösségeket ez idáig még nem vizsgáltak, azonban nagy tengerszint feletti magasságon előforduló száraz üledékek (Lynch és mtsai, 2012, Solon és mtsai, 2018) és periglaciális talajok mikrobiológiai diverzitásával kapcsolatban (Schmidt és mtsai, 2009) már voltak kutatások. Peruban 5400 m tszf magasságon extrém napi hőingásnak kitett talajokban aktív N-körforgást mutattak ki, bizonyítva a klontárakkal

kimutatott, Cyanobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes alkotta közösségek aktivitását (Schmidt és mtsai, 2009). Lynch és mtsai (2012) a Lluillailaco vulkánon 6330 m tszf magasságban lévő száraz üledékek baktériumközösségeit vizsgálták klóntárakkal és túlnyomórészt a Chloroflexi, valamint az Actinobacteria törzsek alkotta közösségeket tártak fel. Solon és mtsai (2018) a Lullailaco vulkán száraz és penitenteszek olvadása által befolyásolt nedves üledékeket vizsgálták, eredményeik alapján a tengerszint feletti magasság határozta meg a baktériumközösségek diverzitását.

Bár vizük máshonnan ered, a periglaciális környezetek magashegyi oligotróf tavai is a magashegyi permafroszt tavakhoz hasonló élőhelynek tekinthetők, hiszen az alacsony hőmérséklet, a magas UV sugárzás és az alacsony tápanyag koncentráció közös jellemzőjük. Ilyen tavakat vizsgáltak például a Mount Everesten. A 16S rRNS gén alapú klóntárak elemzése alapján a morénából és jégolvadékból képződő tavakban szintén a tengerszint feletti magassággal volt összefüggésben a baktériumközösségek taxon-diverzitása és abundanciája (Liu és mtsai, 2006).

2.2.3 *Glacio-vulkanikus környezetek baktériumközösségei*

A jeges szárazföldi területeken található geotermikus rendszerek egyedülálló mikrobiológiai diverzitásnak adnak otthont, hiszen nagy hőmérsékleti gradienssel rendelkeznek, és a vulkáni hatás révén gyakorta jellemezhetők valamilyen szélsőséges karakterrel (pl. savas kémhatással;), ami lehetőséget biztosít az extrémofil mikroorganizmusok kutatására (Cousins és mtsai, 2018). Glacio-vulkanikus rendszerek szórványosan fordulnak elő a bolygónkon, ám számos mikrobiológiai kutatás középpontjában állnak. Bár az alacsony pH, nagy tengerszint feletti magasság, fagyási-olvadási ciklusok, és alacsony tápanyagkoncentráció baktériumközösségekre gyakorolt hatásait egyre több kutatás vizsgálja, ezen körülmények együttes előfordulása ritka, így kombinált hatásukról nincs ismeretünk.

A vulkáni területeken található szélsőséges kémhatással, hőmérséklettel, magas fémtartalommal jellemezhető tavak diverz mikrobiológiai közösségeknek adnak otthont, melyekben a Bacteria, az Archaea és az Eukarya domének képviselői egyaránt előfordulnak (Mapelli és mtsai, 2015). A krátertavak közösségeit elsősorban a vulkáni működésnek köszönhetően felszabaduló gázok, a hőmérséklet és a tóvíz, valamint az alapközet kémiai kölcsönhatásai révén kialakult fizikai-kémiai paraméterek határozzák meg (Mapelli és mtsai, 2015).

A Száraz-Andokban a 6000 m tszf körüli fumarolákról elsőként Halloy (1991) számolt be, mint biodiverzitás forráspontokról. A Socompa vulkánon 5750 és 6060 m között található fumarolák környezetében szigetszerűen kialakult diverz közösségekben algák, mohák és zuzmók jelenlétéről írt. Később Costello és mtsai (2009) vizsgálták a Socompa baktériumközösségeinek diverzitását. A meleg (25 °C) fumarola környezetében található üledékekben bevonatszerű fotoautotróf közösségekről számoltak be, melyeket 16S rRNS gén alapú klóntárakkal vizsgáltak és Verrucomicrobia, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria és Proteobacteria képviselői által alkotott leegyszerűsödött közösségeket azonosítottak. A vulkánon található más környezetekkel (fumarola melletti hideg, illetve száraz üledékek) összehasonlítva az üledék fokozott nedvességtartalmának köszönhető a lokálisan diverz baktériumközösség (Costello és mtsai, 2009). A Simba vulkán savas krátertavában (pH 3,93; 5930 m tszf) szintén klóntárakkal vizsgálták a baktériumközösségeket, és az alfa- és gammaproteobaktériumok mellett kisebb arányban a Cyanobacteria, valamint a Bacteroidetes képviselőit is kimutatták (Demergasso és mtsai, 2010). Sem a Socompa fumaroláinak környezetéből, sem a Simba vulkán krátertavából nem ismertek tenyésztési eredmények.

Glacio-vulkanikus területek baktériumközösségeit vizsgálták többek között az Antarktiszon és Izlandon is. Az antarktisi Mount Erebus (3794 m) vulkán csúcsához közeli sötét oligotróf jégbarlangok és forró vulkanikus talajok mikrobiológiai diverzitását egyaránt 16S rRNS gén alapú klóntárakkal tárták fel (Tebo és mtsai, 2015, Soo és mtsai, 2009). A jégbarlangok közösségei változatosak, de kivétel nélkül leegyszerűsödöttek voltak, egyikben mindössze 11 OTU-t mutattak ki, a vizsgált szekvenciák több, mint 95%-a a Chloroflexi (Ktedonobacterales) és az Acidobacteria törzsekbe tartozott (Tebo és mtsai, 2015). Érdekes megjegyezni, hogy a jégbarlangok közösségeiben az Archaea domén képviselői nem voltak kimutathatók (Tebo és mtsai, 2015). A vulkán állandóan közel 65 °C hőmérsékletű talajából nyert klónok legfeljebb 93%-os hasonlóságot mutattak más ismert környezeti klónokkal vagy tenyésztésbe vont baktériumokkal (Soo és mtsai, 2009). A Chloroflexi és az OP10 kandidátus törzshöz azonos mértékben hasonlító csoport volt a leggyakoribb a vizsgált üledékben, valamint az Acidobacteria törzs egy képviselője (Soo és mtsai, 2009).

Glacio-vulkanikus talajok az Déli-Shetland szigetek közé tartozó Deception-szigeten vannak, ahonnan dúsitó tenyésztéssel és DGGE alkalmazásával vizsgálták a 75-95 °C hőmérsékletű üledékek baktériumközösségeinek diverzitását, és a *Geobacillus*, a *Brevibacillus*, a *Bacillus* és a *Thermus* nemzetségeket mutatták ki (Muñoz és mtsai, 2011).

Ugyanezen a területen Bendia és mtsai (2018) kvantitatív PCR-rel a legmelegebb, 98 °C-os üledékben nem tudtak baktériumokat kimutatni, néhány fokkal alacsonyabb hőmérsékleten viszont már kb. 10^4 TKE g⁻¹ volt a baktériumok becsült száma az üledékben. Különböző inkubációs hőmérsékleteket (0 és 60 °C) alkalmazva a hideg, illetve meleg üledékekből pszichrofil (pl. *Psychrobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*) és termofil (pl. *Thermus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus*) baktériumokat egyaránt izoláltak (Bendia és mtsai, 2018).

Izlandon is sok glacio-vulkanikus területet vizsgáltak, Cousins és mtsai (2018) a Kverkfjöll vulkánon alacsony oldott oxigén tartalmú meleg és savas (68-34,7 °C, pH 3,6-4,8) forrás üledékének baktériumközösségét piroszekvenálással tárták fel, és a legmelegebb helyeken az Aquificae kiugróan magas relatív abundanciáját írták le. Alacsonyabb hőmérsékleten a Proteobacteria mellett a Chloroflexi, a Bacteroidetes, a Firmicutes és a Deinococcus-Thermus is nagyobb arányban voltak jelen (Cousins és mtsai, 2018).

Számos extrém savas élőhely baktériumdiverzitásáról részletes információkkal rendelkezünk. Az antropogén hatások (bányászat) miatt savassá vált Tinto folyó vizében előforduló baktériumközösségeket tenyésztési és molekuláris biológiai módszerekkel egyaránt vizsgálták (Amils és mtsai, 2007, Sánchez-Andrea és mtsai, 2012). A könnyen megközelíthető terület alkalmas arra, hogy az acidofil baktériumok adaptációs stratégiáit, valamint biogeokémiai folyamatokban betöltött szerepét is feltárják (Amils és mtsai, 2007). A costa ricai Poás vulkán ultrasavas (pH -1-1,5) krátertavának, a Laguna Calientének mikrobiológiai diverzitását újgenerációs DNS szekvenálással vizsgálták és egyetlen faj, az *Acidiphilium angustum* kiugróan magas (97,7%) jelenlétét mutatták ki (Hynek és mtsai, 2018). A baktérium redukált kénformák (pl. elemi kén) oxidálásával nyerheti energiáját, 1986-ban egy savas bányavíz környezetéből vonták először tenyésztésbe (Wichlacz és mtsai, 1986).

3 Célkitűzések

A Puna de Atacama-fennsík és az Ojos del Salado vulkán a különleges magashegyi sivatagi klímának, a nagy tengerszint feletti magasságnak, illetve a vulkán működésének köszönhetően több szempontból is szélsőséges élőhelynek tekinthető. A 3770 és 4350 m tszf magasságban fekvő két sós tóban, a permafroszt határ felett található olvadéktóban, illetve a vulkán mellékráterének savas kémhatás jellemezte élőhelyein egyaránt a különleges körülményekhez adaptálódott extremofil baktériumok közösségeinek jelenlétét feltételeztük. A Puna de Atacama-fennsík és az Ojos del Salado vulkán vizes élőhelyein előforduló baktériumközösségek összetételéről ez idáig csak korlátozott információk állnak rendelkezésre. Célunk volt, hogy polifázikus módszerek alkalmazásával feltárjuk a vizsgált élőhelyekre jellemző baktériumközösségek filogenetikai diverzitását, valamint a tenyésztés során nyert törzsek ökológiai toleranciáját.

A három élőhely vizsgálata során az alábbi célokat tűztük ki:

- Tenyésztési és molekuláris módszerekkel feltárjuk a Laguna Santa Rosa üledékében, valamint a Laguna Verde melegvizes medencéjének mikrobiális bevonatában élő baktériumközösségek filogenetikai diverzitását. Megvizsgáljuk a két magashegyi sós tó környezetéből tenyésztésbe vonható baktériumtörzsek NaCl toleranciáját. Összehasonlítjuk a Laguna Santa Rosa és Laguna Verde esetében feltárt molekuláris- és tenyésztendő diverzitást.
- Feltárjuk a permafroszt olvadéktó környezetében jellemző baktériumközösségek térbeli heterogenitását. Ehhez összehasonlítjuk a különböző mélységből származó permafroszt, tavi üledékek, valamint a víz baktériumközösségeinek diverzitását. Meghatározzuk a tavi üledék tenyésztendő diverzitását, és a tenyésztésbe vont törzsek pH változásra adott ökológiai toleranciáját.
- Megvizsgáljuk a kráter vulkáni hatásnak kitett, aktív fumarolák által befolyásolt környezetében a hideg, illetve meleg vízzel átitatott üledékek bakteriális diverzitását. Az újgenerációs DNS szekvenálással nyert adatokat az olvadéktó környezetével összehasonlításban értékeljük, így következtetve a vulkáni környezet baktériumközösségekre gyakorolt hatására. A tenyésztendő diverzitást, illetve a tenyésztésbe vont baktériumtörzsek pH-ra adott ökológiai toleranciáját szintén az olvadéktóval összehasonlításban értékeljük.

4 Anyagok és módszerek

4.1 A mintavételi helyek bemutatása

4.1.1 A Puna de Atacama-fennsík két magashegyi sós tava

A Puna de Atacama-fennsíkon két magashegyi sós tavat, a Laguna Santa Rosát és a Laguna Verdét vizsgáltuk.

A Laguna Santa Rosa 3770 m tengerszint feletti magasságon található a Maricunga sósivatag mellett (D 27,081085; Ny 69,175022). A sekély (<1,2 m) tó nyílt vízfelülete kb. 2 km², a partmenti régióban helyenként zombékos, agyagos terület, máshol kopár sivatagi kőtörmelék vagy sós síkság határolja (5. ábra).



5. ábra Az Ojos del Salado helyzete Chile térképén (a), a Laguna Santa Rosa és a Laguna Verde elhelyezkedése a Puna de Atacama-fennsíkon (műholdas felvétel, b), a Laguna Santa Rosa (c) és a Laguna Verde (d) látképe

A 2016. január 30-i mintavétel során 2-2 mintát gyűjtöttünk a tószegély sekély vízzel borított üledékéből, valamint a tó környezetében kialakult tözeges terület vizenyős agyagfoltokból 5 vagy 10 cm mélységből (1. táblázat). A helyszínen meghatároztuk a tó

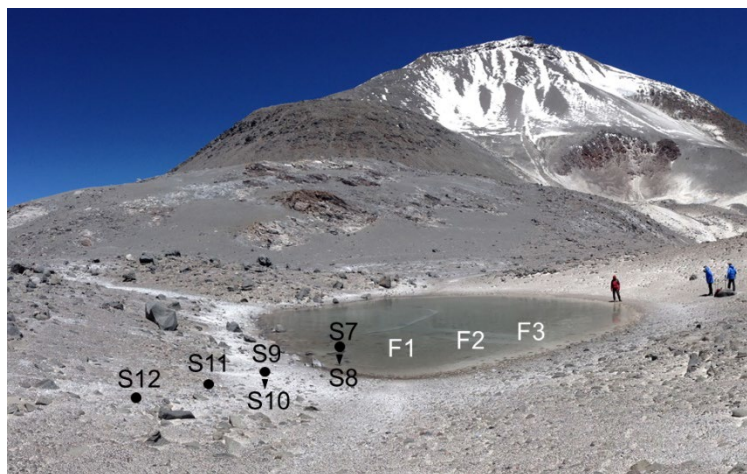
vizének fajlagos vezetőképességét, hőmérsékletét és pH-ját, a tó vizéből pedig vízmintát gyűjtöttünk további vízkémiai mérésekhez.

A Laguna Verde 4350 m tszf magasságon fekszik (D 26,890288; Ny 68,486858). A kb. 15 km² vízfelszínnel rendelkező, maximum 4 m mély tó vize közel telített sókoncentrációval jellemezhető, környezetében számos melegvizes forrás fakad. A források a tóba sok esetben medencéken keresztül érkeznek, ahol az aljzaton vastag, feltehetően mikroorganizmusok alkotta többnyire vöröses árnyalatú bevonat alakult ki (5. ábra).

A 2016. február 1-i mintavétel során egy üledék- és három bevonatmintát vettünk a tó partján található egyik melegvizes lagúnából (1. táblázat). A tó vizéből is gyűjtöttünk mintát vízkémiai mérésekhez.

4.1.2 Egy permafroszt degradációval keletkező olvadéktó

Az Ojos del Salado csúcsától északra sekély, permafroszt degradáció során keletkező olvadéktavakat találunk (6. ábra). Az olvadékvíz, mely a lefolyástalan medencékben felgyűlve kis felületű sekély tavakat képez, főként a felengedő permafrosztból, kisebb részben pedig a hóolvadásból származik. Az általunk vizsgált olvadéktó (D 27,088495; Ny 68,534330) kb. 1-1,5 m mély, a 12-15 m átmérőjű víztükör, mely sokszor még nyáron is részben fagyott.



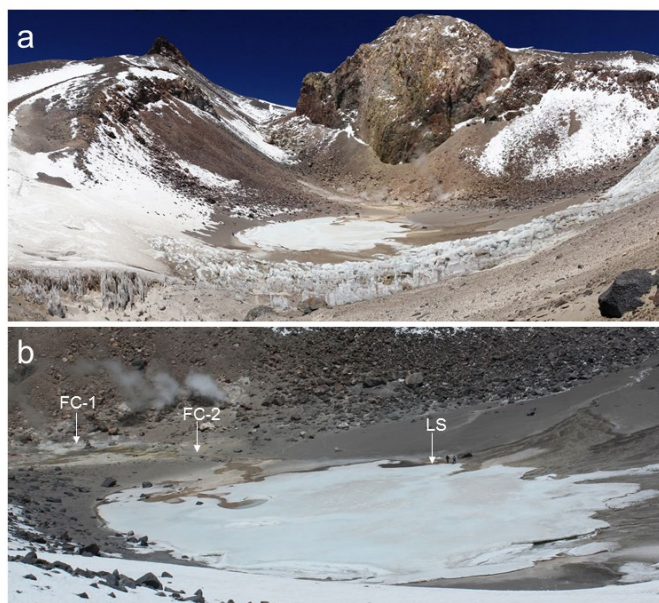
6. ábra A vizsgált permafroszt degradációval keletkező tó, háttérben az Ojos del Salado

A fekete pontokkal jelölt üledékminták az üledék felső 5 cm-éből, a háromszöggel jelölt minták az aktív réteg alsó rétegéből (kb 10 cm mélyről) származnak. A fehérrel jelölt minták a szűrőssel vett vízminták.

A 2016. február 12-i mintavétel során tavi- és tóparti permafroszt aktív réteg üledékmintákat gyűjtöttünk, összesen 6 helyről 3-3 ismétlésben. Az üledékminták a tavi üledékből, valamint 50, 100 vagy 150 cm távolságra a víztől, az üledék felső 5 centiméteréből vagy a permafroszt tábla feletti rétegből, 10 cm mélyről származnak (1. táblázat). A tó vizéből steril fecskendővel 0,22 μ m pórusátmérőjű membránfilterre szűrtünk 100-100 ml vizet szintén 3 párhuzamos mintavétel során, valamint vízkémiai mérésekhez is gyűjtöttünk mintákat.

4.1.3 Az Ojos del Salado vulkán krátere

Az Ojos del Salado csúcsától délnyugatra, 6480 m magasan fekvő mellékráterben található a Föld legmagasabban fekvő tava (D 27,109925; Ny 68,550184), melynek környezetében – a vulkáni hatás révén – fumarolák és meleg források fakadnak (7. ábra). A tavat a fumarolákból eredő savas, meleg (pH 2,1, 40,8 °C) víz, valamint a permafroszt és kis részben a hóborítás olvadásából származó víz táplálja. A savas kémhatáson kívül a magashegyi sivatag klímája is hozzájárul a környezet extrém jellegéhez, a meleg víz jelenlétével pedig a környezeti tényezők különleges kombinációja jön létre. A krátertó nagyobb felszínű (kb. 0,006 km²) mint az előbb bemutatott permafroszt olvadéktavak, mélysége ismeretlen: 2014-ben a tómeder egészében, 2016-ban pedig egy részén fagyott jég volt megfigyelhető.



7. ábra Az Ojos del Salado mellékráterének látképe a kráter peremétől (a) és a mintavételi helyek a krátertó környezetében (b)

2016. február 14-én a mintavétel során hideg és meleg vízzel átitatott üledékmintákat vettünk a tóból, valamint a fumarolákból eredő melegvizes patak üledékéből, az eredési helytől 20 (FC-1) és 50 (FC-3) méter távolságra. A minták az üledékek felső 5 cm-éből származtak. A tó vizéből vízkémiai elemzésre is gyűjtöttünk mintát (KR-F).

4.2 Mintavétel

A mintavétel a Magyar Száraz-Andok Kutatási Program keretében történt. A mintavétel során a tavi és permafroszt üledékmintákat steril spatulával gyűjtöttük 50 ml térfogatú steril Falcon csövekbe. Vízmintavételkor 100 ml vizet a helyszínen 0,22 μm pórusátmérőjű cellulóz membránfilterre (Millipore) szűrtünk egy steril fecskendő segítségével. Vízkémiai vizsgálatokhoz további 500-500 ml mintát vettünk steril műanyag flakonokba. A mintákat a laboratóriumban történő feldolgozásig 0-8 °C-on tároltuk. Az Ojos del Salado vulkán környéki vizes élőhelyekről származó minták jellemzőit az 1. táblázat összesíti.

A tavak vizének és a fumarolákból eredő vizek fizikai-kémiai változói közül a hőmérséklet, pH és fajlagos vezetőképesség mérése a helyszínen a mintavételkor történt egy PCSTestr 35 multiméter (EuTech Instruments, Thermo Scientific) segítségével. További vízkémiai változók (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Fe koncentráció), valamint a TOC (teljes szerves szén), a TN (teljes nitrogén) és az IC (szervetlen szén) meghatározását Dr. Jurecska Laura végezte az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén.

1. táblázat Az Ojos del Salado vizes élőhelyeiről származó minták jellemzői és a vizsgálatok módjának összegzése

	Mintaazonosító	Párhuzamos minták	Mintatípus	Víz hőmérséklet (°C)	pH	Üledékmélység (cm)	Megjegyzés	T	D	S
L. Santa Rosa, 3770 m	SR-S1	a, b, c	üledék	18,1	9,5	5	Tószegélyi üledék	x	x	x
	SR-S2	a, b, c	üledék	18,1	9,5	10	Tószegélyi üledék	x	x	x
	SR-S3	a, b, c	üledék	18,1	9,5	5	Agyagos üledék	x	x	x
	SR-S4	a, b, c	üledék	18,1	9,5	10	Agyagos üledék	x	x	x
	SR-W*	-	víz	18,1	9,5	-	-			
L. Verde, 4350 m	LV-S1	a, b, c	üledék	34,5	8,8	5	Meleg lagúna üledék	x	x	x
	LV-S2	a, b, c	üledék	34,5	8,8	0	Meleg lagúna bevonat	x	x	x
	LV-S3	a, b, c	üledék	34,5	8,8	0	Meleg lagúna bevonat	x	x	x
	LV-S4	a, b, c	üledék	34,5	8,8	0	Meleg lagúna bevonat	x	x	x
	LV-P	a, b, c	víz	34,5	8,8	-	18 nap inkubáció, purhab			x
	LV-W*	-	víz	34,5	8,8	-	-			
Permafroszt olvadtó, 5900 m	S7	a, b, c	üledék	9,2	8,8	5	Szürke szemcsés	x	x	x
	S8	a, b, c	üledék	9,2	8,8	10	Szürke szemcsés	x	x	x
	S9	a, b, c	üledék	9,2	8,8	5	Szürke szemcsés	x	x	x
	S10	a, b, c	üledék	9,2	8,8	10	Szürke szemcsés	x	x	x
	S11	a, b, c	üledék	9,2	8,8	5	Szürke szemcsés	x	x	x
	S12	a, b, c	üledék	9,2	8,8	5	Szürke szemcsés	x	x	x
	F	1, 2, 3	víz	9,2	8,8	-	100 ml, filterre szűrve			x
	TO-W*	-	víz	9,2	8,8	-	-			
Krátertó, 6480 m	FC-1	-	üledék	40,8	2,1	5	Forrástól 40 m-re	x		x
	FC-2	-	üledék	34,7	2,1	5	Forrástól 80 m-re	x		x
	LS	-	üledék	3,8	4,9	5	Szürke szemcsés	x		x
	FC-W*	-	víz	40,8	2,1	-	-			
	LW*	-	víz	3,8	4,9	-	-			

* vízkémia; T: tenyésztés, D: DGGE, S: NGS

4.3 Tenyésztési vizsgálatok

4.3.1 Minták szélesztése, alkalmazott táptalajok

A tenyésztéshez kétféle módosított táptalajt alkalmaztunk a vizsgált minta származási környezetétől függően. Az alkalmazott táptalajokat a hasonló környezetekből (pl. permafroszt üledékek, gleccser kriokonitok, gleccserjég) végzett tenyésztési vizsgálatok során a szakirodalomban gyakran alkalmazott táptalajok közül választottuk ki. A kiválasztás során figyelembe vettük azt is, hogy a megelőző molekuláris biológiai vizsgálatok során 16S rRNS gén klontárakkal feltárt baktériumközösségekben milyen taxonokat azonosítottunk. Az egyes minták esetében felhasznált táptalajokat és az alkalmazott inkubációs hőmérsékletet az 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A tenyésztés körülményei (alkalmazott táptalajok, sókoncentráció, pH, inkubációs hőmérséklet és idő) az egyes minták esetében

Minta származási helye	Minta neve	Táptalaj	pH	Inkubáció
Laguna Santa Rosa, Laguna Verde	SR-S1, SR-S2, SR-S3, SR-S4; LV-S1, LV-S2, LV-S3, LV-S4	R2A + 7% NaCl PYG + 7% NaCl	8,6	20 °C, 2 hét
Olvadéktó	S7, S8, S9, S10, S11, S12	R2A PYG	7,0	10 °C, 6 hét
Krátértó	LS-1	R2A PYG	7,0	10 °C, 6 hét

Az R2A táptalaj (DSMZ 830) összetétele 1000 ml vízhez:

Élesztőkivonat	0,5 g
Pepton	0,5 g
Casamino savak	0,5 g
Glükóz	0,5 g
Keményítő (vízoldékony)	0,5 g
Na-piruvát	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄	0,05 g
agar	15 g

A PYG táptalaj (DSMZ 1140) összetétele 1000 ml vízhez:

Bacto pepton	5,0 g
Élesztőkivonat	0,2 g
Glükóz	5,0 g
Húskivonat	3,0 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1,5 g
agar	15 g

7% NaCl tartalmú táptalaj alkalmazása esetén mindkét táptalajt 70 g/l NaCl-al egészítettük ki (lásd 2. táblázat). A táptalajokat autoklávban sterilizáltuk 121 °C hőmérsékleten, 1,2 atm nyomáson 20 percen keresztül.

A tenyésztéskor minden üledékminta 1 g-nyi mennyiségét 99 ml steril vízben homogenizáltuk, majd 5 tagú, tizes léptékű hígítási sort készítettünk. A hígítási sor minden tagjából 100-100 µl-t szélesztettünk 3-3 tápagarlemez felületére.

4.3.2 Csíraszámbecslés

Az inkubációs idő lejártakor a csíraszámbecsléshez a kifejlődött különálló telepek átlagát azon hígításokból számoltuk, ahol a kolóniák száma 20 és 200 között volt egy Petri-csészén. A csíraszámbecslést követően a szélesztéskor alkalmazottal megegyező összetételű R2A vagy PYG ferde agarra izoláltuk a kiválasztott telepeket.

4.3.3 DNS kivonás és polimeráz láncreakció (PCR) baktériumtörzsekből

A tiszta tenyészetekből üveggyöngyös feltárással izoláltunk DNS-t. Egy 500 µl térfogatú mikrocentrifuga csőbe 100 µl steril DEPC (dietil pirokarbonát) kezelt vizet és 0,04 g steril üveggyöngyöt (0,1 mm) mértünk, amiben egy oltókacsnyi baktérium biomasszát szuszpendáltunk el, majd Retsch Mixer Mill MM301 (Retsch, Haan, Németország) típusú sejtmalomban 30 Hz-en 2 percig homogenizáltuk. A sejtes törmeléket Hermle Z300 típusú mikrocentrifugában (Hermle LaborTechnik GmbH, Wehningen, Németország) 30 másodpercig 10000 rcf-en leülepítettük, majd Thermal cycler 2720 készülékben (Applied Biosystems, Foster City, USA) 98 °C-on 5 percig hősokknak tettük ki a szuszpenziót. Ismételt centrifugálás (30 másodperc, 10000 rcf) után a felülúszót használtuk a polimeráz láncreakciók (PCR) során.

A tiszta tenyészetek azonosításához a 16S rRNS gént Bacteria-specifikus 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', Lane, 1991) és 1401R (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3', Nübel és mtsai, 1996) primerekkel szaporítottuk fel. A PCR reakcióelegy összetétele 1 egység LC *Taq* DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1X *Taq* puffer NH₄SO₂-vel (Thermo Fisher Scientific Inc.), 200-200 µM mind a négyféle dNTP-ből (Thermo Fisher Scientific Inc.), 2,0 mM MgCl₂, 0,65 mM mindkét primerből, és 20 ng genomi DNS templát volt 50 µl végtérfogatban (DEPC kezelt vízzel hígítva).

A PCR reakció hőprofilja a következő volt:

kezdeti denaturáció	95 °C	5 percig	
denaturáció	94 °C	30 másodperc	
anneláció	52 °C	45 másodperc	32 ciklus
elongáció	72 °C	60 másodperc	
végző extenzió	72 °C	10 perc	

A PCR reakció sikerességét 1%-os agaróz gélben (100 ml TBE [Tris-borát-EDTA] puffer, 1 g agaróz, 1,5 µl Sybr Safe DNS festék [Thermo Fisher Scientific Inc.]) 20 perces 100 V-os futtatást követően UV megvilágítás alatt ellenőriztük.

4.3.4 *Baktériumtörzsek csoportosítása ARDRA módszerrel*

A baktériumtörzsekből nyert PCR termékeket ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) módszerrel csoportosítottuk. Az emésztésnél a reakcióelegybe 10 µl PCR termékhez adtunk 0,24 µl *Hin*6I (Thermo Fisher Scientific Inc., hasítási helye: 3'-G[^]CGC-5') és *Bsu*RI (Thermo Fisher Scientific Inc., hasítási helye: 3'-GG[^]CC-5') restrikciós enzimet, illetve 2 µl Tango (*Hin*6I) vagy R (*Bsu*RI) puffert és 7,76 µl steril desztillált vizet, majd 37 °C-on 3 órán át emésztést végeztünk. Az egyes törzsekre jellemző hasítási mintázatot úgy kaptuk meg, hogy a 20 µl emésztett terméket 2% agaróz gélben (2 g agaróz, 100 ml TBE puffer, 1,5 µl SyBR Safe DNS festék (Thermo Fisher Scientific Inc.)) 80 V-on 80 percig futtattuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

Az így kapott restrikciós mintázat alapján csoportokat hoztunk létre, és minden csoportból legalább egy reprezentatív törzs 16S rRNS gén bázissorrendjét Sanger

szekvenálással határoztuk meg az LGC Genomics (Németország) szolgáltatásának felhasználásával.

A szekvenciák minőségét a Chromas Lite (www.techneleysium.com.au) szoftverrel ellenőriztük. A filogenetikai rokonsági viszonyokat a szekvenciák hasonlósága alapján az BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool, Altschul és mtsai, 1997) internetes program segítségével, az NCBI adatbázis felhasználásával határoztuk meg. A reprezentatív törzsek filogenetikai kapcsolatainak feltérképezésére a MEGA7 programcsomaggal (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Kumar és mtsai, 2016) hoztunk létre neighbor-joining (Saitou és Nei, 1987) filogenetikai dendrogramokat. A baktériumtörzsek szekvenciáit a GenBank adatbázisban MH472800-MH472822, MH667812-MH667859 és MK634703-MK634733 azonosítók alatt tettük nyilvánossá.

4.3.5 Baktériumtörzsek ökológiai toleranciájának meghatározása

A baktériumtörzsek pH és NaCl toleranciáját nutrient táplevesben (DSMZ 1) való növekedésük alapján vizsgáltuk.

A nutrient tápleves (DSMZ 1) összetétele 1000 ml vízhez:

pepton	5,0 g
húskivonat	3,0 g

A nutrient táplevest autoklávban sterilizáltuk 121 °C hőmérsékleten, 1,2 atm nyomáson 20 percen keresztül.

A pH tolerancia teszteknel a tápleves kémhatását pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 és 7,0 értékekre állítottuk be 1 M HCl hozzáadásával, míg a sótolerancia teszteknel a táplevesek NaCl koncentrációja 0,0; 2,5; 5,0; 7,0; 10,0 % (m/V) volt. A pH teszteknel a táplevesek sókoncentrációja 0% volt (hiszen csak az édesvízi minták esetében készült ilyen teszt), míg sótolerancia tesztek esetében a tápleves kémhatása pH 8.6 volt (hiszen csak a sós tavakból származó izolátumokra készült ilyen teszt). A törzseket az ökológiai tolerancia vizsgálatok előtt a törzsfenntartással megegyező pH-jú és NaCl koncentrációjú nutrient táplevesben inkubáltuk 2 héten keresztül, majd 100-100 µl-t tovább oltottunk tesztcsövekbe. Minden vizsgált törzs növekedését 3 párhuzamosban értékeltük a különböző sókoncentrációjú vagy pH értékű táplevesekben. Az inkubációs hőmérséklet az eredeti tenyésztésnek megfelelően 20 °C vagy 10 °C volt.

Két hetes inkubációt követően a táplevesek zavarosodása alapján következtettünk a növekedés mértékére. Ezt a táplevesek optikai denzitásának (OD) mérésével állapítottuk meg. Ehhez a baktériumtörzseket tartalmazó tápleveseket vortex segítségével alaposan felfuszpendáltuk és 300- 300 µl mennyiséget 96 lyukú mikrotiter lemezekbe mértünk. Negatív kontrollként a steril táplevesek OD értékeit is meghatároztuk. Az OD értékek mérését 620 nm-es hullámhosszon egy TECAN Sunrise ELISA readerrel és a Magellan szoftverrel végeztük (TECAN Life Sciences, Männedorf, Svájc).

A különböző táplevesekben mért OD érték különbségeinek összehasonlítására a Past3 szoftverrel (Hammer és mtsai, 2001) teszteltük az egyes OD átlagok közötti eltérések szignifikanciáját (Mann-Whitney U próba) és szemléltetésképp violin plotokat hoztunk létre. Ehhez a kapott optikai denzitás adatokból levontuk a steril táptalaj (negatív kontroll) optikai denzitását, és az így kapott adatokat ábrázoltuk a grafikonon.

4.4 A közösségi DNS kivonása

A közösségi DNS kivonását a DNeasy PowerSoil Kittel (QIAGEN) végeztük a gyártó által meghatározott protokoll alapján azzal a változtatással, hogy a sejtek fizikai feltárását 2 percig 30 Hz-en történő rázatással végeztük egy Retsch Mixer Mill MM301 (Retsch, Haan, Németország) sejtmalomban. A DNS kivonás sikerességét PCR (lásd 4.3.3. fejezet) során ellenőriztük. A közösségi DNS mintákat -20 °C-on fagyaszta tároltuk, a későbbiekben denaturáló gradiens gélelektroforézis és újgenerációs DNS szekvenálás során használtuk fel.

4.5 Denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE)

A DGGE egy molekuláris ujjlenyomat módszer, mely lehetővé teszi a közösségek összehasonlítását direkt bázissorrend meghatározás nélkül. Az eljárás során a közösségi DNS-ből felszaporított azonos hosszúságú amplikonokat egy denaturáló ágens gradienst tartalmazó poliakrilamid gélben választják el, létrehozva a vizsgált mintára jellemző molekuláris ujjlenyomatot (Muyzer és mtsai, 1993). Az elválasztás alapja az adott (pl. 16S rRNS) génszakaszon belüli taxononként különböző bázisösszetétel. A denaturáló gradienst tartalmazó gélben a PCR termékek két szála bázisösszetételüktől függően más-más denaturálószer koncentráción válik szét egymástól. A nagyobb GC tartalmú amplikonok nagyobb távolságot tesznek meg a poliakrilamid gélben. A DGGE-hez használt PCR termékek előállításakor speciális, guaninban és citozinban gazdag, úgynevezett

GC-kapcsot tartalmazó primert alkalmaztunk (27F-GC), mely megakadályozta a DNS fragmentum két szálának teljes szétválását, lehorgonyozva a DNS molekulát a denaturáció helyén (Muyzer és mtsai, 1993).

A közösségi DNS 16S rRNS gén V3-V4 régióját a korábban leírt módon először a 27F és 1401R primerekkel szaporítottuk fel, majd erre a termékre egy semi-nested PCR-t készítettünk a Bacteria-specifikus 519R (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3', Turner és mtsai, 1999) és a GC-kapcsot kialakító guaninban és citozinban gazdag szekvenciát (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCG GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3') tartalmazó 27F-GC primerekkel. A PCR reakcióelegyének összetétele az alkalmazott primereken kívül megegyezett a 4.3.3. fejezetben leírtakkal. A hőprofil esetében a végső extenzió (72 °C) hosszát 30 percre növeltük.

A DGGE futtatását az Ingeny PhorU (Ingeny International BV, Leiden, Hollandia) készülékben végeztük 40-60% denaturálószer gradienst tartalmazó poliakrilamid gélben. A 7%-os poliakrilamid (PAA) gél összetételét a 3. táblázatban megadottak szerint állítottuk össze.

3. táblázat A DGGE során használt poliakrilamid gél összetétele

	40% PAA gél	60% PAA gél
Akrilamid (40%)	4,2 ml	4,2 ml
50x TAE* puffer	480 µl	480 µl
Urea	4,0 g	6,0 g
Formamid	3,84 ml	5,76 ml
Desztillált víz	24 ml végtérfogatig	24 ml végtérfogatig

*TAE: Tris-ecetsav-EDTA puffer

Az összemérést követően szonikátorban buborékmentesítettük a géleket, majd 50-50 µl 20%-os APS (ammónium-perszulfát) és 5-5 µl TEMED (tetrametiletiléndiamin) hozzáadásával indítottuk el a polimerizációt. A mintákhoz a betöltés előtt 9-9 µl loading dye-t adtunk, majd 100 V-on 60 °C-on inkubálva 14 órán át végeztük az elektroforézist. A futást követően etídium-bromidos festést végeztünk és UV transzilluminátorral átvilágítottuk a gél, hogy a mintákra jellemző DNS ujjlenyomatot előhívjuk.

A festést követően a DGGE gélről fotót készítettünk, a gélképet pedig a TotalLab (TL 120) version 2006 (TotalLab Ltd., Newcastle upon Tyne, Egyesült Királyság) szoftverrel elemeztük. A klaszteranalízis során UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means) hasonlósági dendrogramot hoztunk létre, ahol az egymáshoz

viszonyítva legnagyobb hasonlóságot mutató molekuláris ujjlenyomatokkal jellemezhető minták rendeződnek egy csoportba.

4.6 Újgenerációs DNS amplikon-szekvenálás

A minták részletes diverzitáselemzése céljából újgenerációs DNS szekvenálást végeztünk, melyre két különböző újgenerációs DNS szekvenáló platformon került sor. Az Ion Torrent DNS szekvenálást teljes mértékben az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén kiviteleztuk, így ennek a folyamatát részletesen adjuk meg. Az Illumina MiSeq DNS szekvenálást külső szolgáltatásként vettük igénybe, így az elvégzett elemzésnek csak legfőbb paramétereit adjuk közre.

4.6.1 Ion Torrent szekvenálás

A szekvenálást megelőzően a közösségi DNS izolátumokból létrehoztuk az amplikon könyvtárat két körös PCR során. A könyvtárak létrehozása során Ion PGMTM Template IA 500 kit-et használtunk a gyártó utasításainak (MAN0009348, Thermo Fisher Scientific) megfelelően. Első körben felszaporítottuk a 16S rRNS gén V3-V4 régióját a B341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', Herlemann és mtsai, 2011) és módosított B805NR primerekkel (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3', Herlemann és mtsai, 2011). Az amplifikációt három párhuzamosban végeztük el, az egyes reakcióelegyek összetétele 15 µl végtérfogatra 3 µl 1× Phusion HF puffer, 0,15 mM dNTP, 0,375 µM a két primerből, 0,3 µg/µL BSA (szarvasmarha szérum albumin), 0,15 µl Phusion High-Fidelity DNS polimeráz (2U/µl, Thermo Fisher Scientific) és 6,8 µl steril DEPC kezelt víz volt. A PCR reakció hőprofiljában a kezdeti denaturációt (98 °C 5 perc) 20 ciklus követte (denaturáció: 95 °C, 40 másodperc; 55 °C, annealáció: 30 másodperc; extenzió: 72 °C, 1 perc), majd 10 perc végső extenzió 72 °C-on. A második PCR előtt a három párhuzamos reakció PCR termékeit egyesítettük, és ezt használtuk fel templátként a második PCR során.

A második PCR-nél az IonTorrent szekvenáláshoz szükséges adapter szekvencia a forward primeren, míg a minták megkülönböztetésére szolgáló jelölés a reverz primeren kapott helyet. A reakcióelegy összetétele és a hőprofil az első PCR leírásánál megadottakkal megegyezett, azonban 20 helyett ebben a körben csak 10 ciklus futott. A PCR-ek sikerességét 1% agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

Az amplikon termékek tisztítását a Viogene PCR Advanced PCR Clean-up System (Viogene, New Taipei City, Taiwan) kittel végeztük a gyártó protokollja alapján, amelyet a primer dimerek eltávolítása érdekében egy további tisztítási lépés követett 37 µl Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, USA) mágneses gyöngy hozzáadásával és etanolos mosási lépésekkel mágneses állványon. A PCR termékek minőségellenőrzése (az amplikon koncentrációjának és pontos fragmenthosszának meghatározása) Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) műszerrel történt a gyártó utasításai szerint. A kapott mintára jellemző amplikon koncentrációkból kiszámoltuk a szükséges bemérési térfogatokat úgy, hogy az IonTorrent szekvenáláshoz használt könyvtárban az egyes mintákból származó amplikonok koncentrációja a gyártó által megadott 10^6 kópia/µl legyen. Ezt követően templát-pozitív ISP-ket (Ion Sphere Particles) hoztunk létre, mely során az ISP-k felszínére kötött templát DNS-t egy izotermális amplifikációs lépéssel klonálisan felszaporítottuk. Az amplifikációt követően az Ion OneTouch™ ES Instrument (Thermo Fisher Scientific) használatával dúsítottuk a templát-pozitív ISP-ket.

A szekvenálást az Ion Personal Genome Machine™ (PGM™) rendszeren végeztük a gyártó utasításai alapján (MAN0014583) Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kittel és Ion 314™ Chip v2 BC felhasználásával. A nyers jelek értékelését a Torrent Suite™ v5.0.4 szoftver végezte a Torrent Server™-en. A kapott szekvenciák elemzése a mothur v1.38.1 programmal (Schloss és mtsai, 2009) történt a szerzők 454 SOP-ban tett ajánlásai alapján (https://www.mothur.org/wiki/454_SOP letöltve 2017.07.29, Schloss és mtsai, 2011). Minőségi szűréshez a bázismeghatározások minőségi értékeit („using quality scores”) vettük alapul. A szekvenciák illesztése és taxonómiai hozzárendelése az ARB-SILVA SSU Ref NR 123 adatbázis (Quast és mtsai, 2012) alapján zajlott. Bakteriális OTU-k létrehozásához a prokarióták faji elkülönítéséhez ajánlott 97%-os 16S rRNS gén szekvencia hasonlósági küszöböt (Tindall és mtsai, 2010) használtuk. A fajsza- és diverzitásbecslő indexeket szintén a mothur programmal számoltuk. A nyers szekvenciák a PRJNA484891 BioProject azonosító alatt kerültek nyilvánosságra az NCBI SRA adatbázisban.

4.6.2 Illumina MiSeq szekvenálás

A közösségi DNS izolátumokból a 16S rRNS gén V3-V4 régióját Bacteria-specifikus primerekkel (B341F és B805R, lásd 4.6.1. fejezet) szaporítottuk fel PCR során,

valamint 5' végükre Fluidigm CS1 és CS2 univerzális szekvenciákat kapcsoltunk. A PCR premix 25 µl végtérfogatban zajlott és mintánként 5 µl Phusion HF puffert, 11,75 µl vizet, 0,15 mM dNTP-t, 0,66 µM forward és 0,66 µM reverz primert, 0,5 µl BSA-t, 0,5 U Phusion High Fidelity DNS polimerázt és 1,25 µl templátot tartalmazott. Az amplikon könyvtárak tisztítását, minőség-ellenőrzését, koncentráció meghatározását és szekvenálását a Michigan State University (USA) Research Technology Support Facility, Genomics Core laboratóriuma végezte. A szekvenálás 2×250 bp „paired end” eljárásban történt az Illumina által gyártott v2, 500 cycle MiSeq platformon. A szekvencia leolvasások az NCBI SRA adatbázisban a PRJNA484891 BioProject ID alatt érhetők el.

A szekvenciák bioinformatikai elemzése a mothur v1.38.1 (Schloss és mtsai, 2009) szoftverrel a MiSeq SOP (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP, letöltés ideje 2018.04.04, Kozich és mtsai, 2013) alapján történt, azzal a különbséggel, hogy a 'deltaq' paramétert 10-re változtattuk a 'make.contigs' parancsban, valamint a kimérák detektálására a UCHIME (Edgar és mtsai, 2011) szoftvert használtuk, és eltávolítottuk az adathalmazból a singleton szekvenciákat Kunin és mtsai (2010) javaslatai alapján. A taxonómiai besorolást 1000 iteráció alapján számolt legalább 80%-os bootstrap konfidencia érték alkalmazásával az ARB-SILVA SSU Ref NR 132 adatbázisa (Quast és mtsai, 2012) alapján végeztük.

Az OTU-k elkülönítéséhez 0,15-ös cutoff értéket állítottunk be a mothur „dist.seqs” parancsánál, és a prokarióták faji elkülönítésénél figyelembe vett 97%-os 16S rRNS gén szekvencia hasonlóságot alkalmaztuk (Tindall és mtsai, 2010).

Az NGS adatok elemzésénél a diverzitásindexeket a mothur szoftverrel számoltuk ki. Az adatvizualizációk közül az oszlopdiagramokat az Excelben, a főkomponens analízist a Past3 szoftverrel (Hammer és mtsai, 2001), a buborékdiagramokat a Plotly (<https://plot.ly>), a Venn-diagramokat a Genti Egyetem online felületén (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) hoztuk létre.

5 Eredmények és értékelésük

5.1 Baktériumközösségek diverzitása a Laguna Santa Rosa és Laguna Verde tavakban

5.1.1 A tavak vizének fizikai és kémiai paraméterei

A helyszíni mérések alapján a Laguna Santa Rosa vizének hőmérséklete 18,8 °C, míg a Laguna Verde melegvizés medencéjének vize 38,8 °C volt. A két tóból származó vízminták (SR-W és LV-W) kémiai jellemzőinek vizsgálata során összesen 12 paramétert határoztunk meg laboratóriumi mérésekkel (4. táblázat). A vízmintákat az üledék- és bevonatmintákkal azonos időpontokban vettük, így a mért paraméterek a mintavétel időpontjában jellemző állapotot tükrözik.

4. táblázat A Puna de Atacama-fennsík sós tavainak vízkémiai paraméterei

	SR-W	LV-W
Hőmérséklet (°C)	18,8	38,8
pH	8,1	6,8
Fajl. vez. kép (μS/cm)	5000	6260
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0,4	0,1
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0,02	0,03
NO ₃ ⁻ (mg/l)	27	4,3
Fe (mg/l)	<0,01	<0,01
SO ₄ ²⁻ (mg/l)*	n.a.	600
Cl ⁻ (mg/l)	1350	1490
IC (mg/l)*	n.a.	17,4
TOC (mg/l)	3,3	8,8
TN (mg/l)	4,5	1,3

* Az SR-W esetében a korlátozott mintamennyiség miatt nem volt lehetőség szulfát és szerves szén mérések elvégzésére; n.a: nincs adat

Mindkét tó vizét magas fajlagos vezetőképesség jellemezte. A Laguna Santa Rosa alkalikus vizében az összes nitrogén tartalom (TN) több, mint háromszorosa volt a Laguna Verde vizében mértnek, ami elsősorban a magas nitrát koncentrációnak volt köszönhető.

A nitrát a Laguna Santa Rosa környezetében a madarak (főként flamingók) ürülékéből kerülhet a tóba.

5.1.2 A tavi üledék és bevonatminták tenyésztési vizsgálatának eredményei

Tenyésztést kétféle táptalajon (R2A és PYG) végeztünk, melyek mindegyikét 7% (m/V) NaCl-dal egészítettük ki. A kisebb szerves anyag tartalmú R2A lemezekon a Laguna Santa Rosa minták esetében átlagosan két nagyságrenddel több telep fejlődött ki, mint a nagyobb tápanyagtartalmú PYG lemezekon (5. táblázat). Az R2A táptalaj a Laguna Verde minták tenyésztése során is hatékonyabbnak bizonyult, ugyanis a melegvízes medencékből származó minták esetében a PYG táptalajon nem volt növekedés. Ebből arra lehet következtetni, hogy mindkét tóban alacsony szerves anyag koncentrációhoz alkalmazkodott oligokarbofil szervezetek fordultak elő. A becsült átlagos telepszám R2A agaron a két vizsgált tó esetében hasonló volt (5. táblázat).

5. táblázat A Laguna Santa Rosa (SR) és Laguna Verde (LV) sós tavak üledékéből és bevonatából végzett tenyésztés során kapott becsült telepképző egységek (TKE g⁻¹) száma az alkalmazott táptalajok (R2A, PYG) esetében

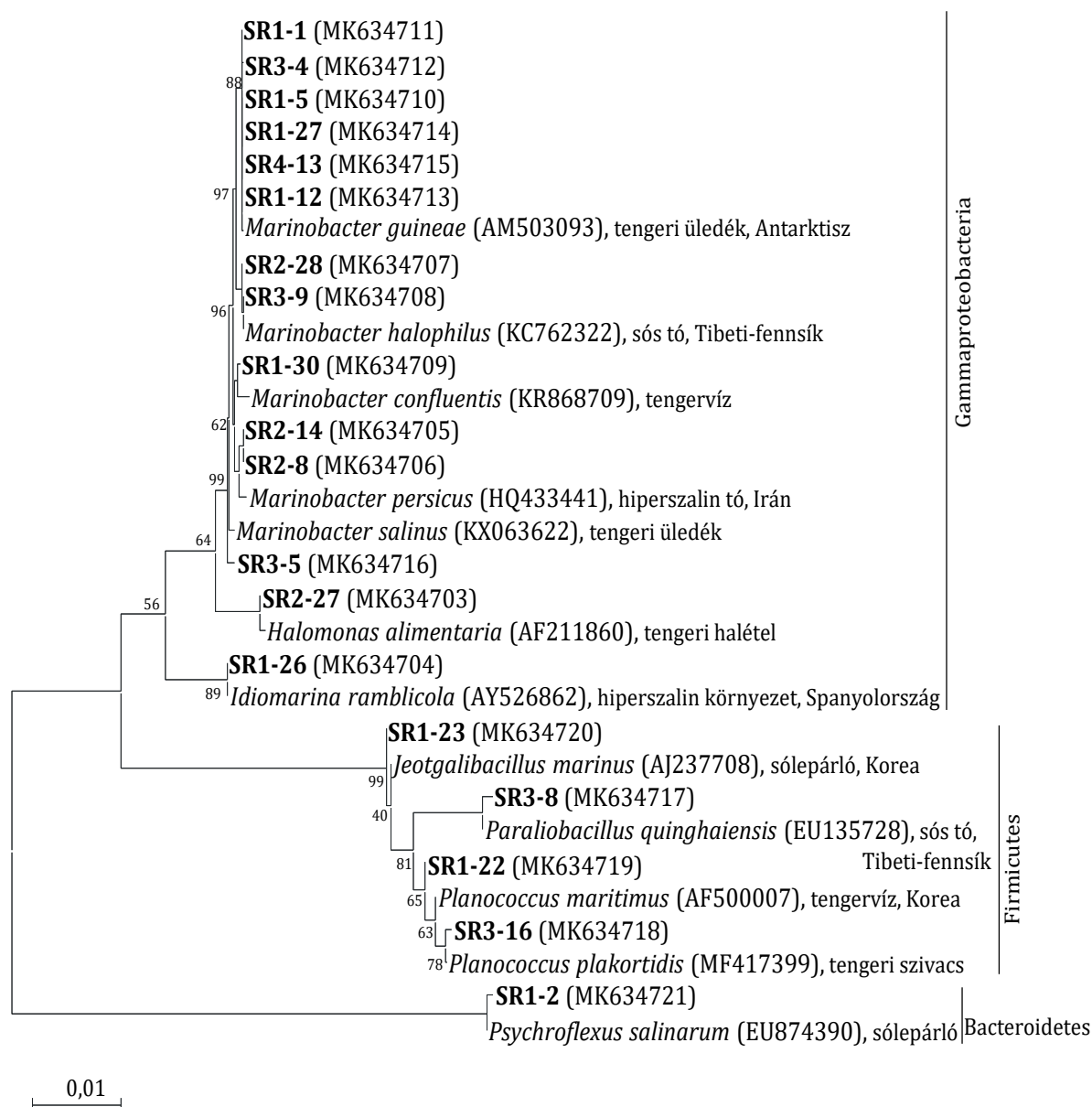
Minta jelzése	R2A	PYG	Minta jelzése	R2A	PYG
SR-S1	5,1×10 ⁶	4,0×10 ⁴	LV-S1	1,3×10 ⁶	n.n
SR-S2	9,3×10 ⁵	1,2×10 ⁴	LV-S2	1,6×10 ⁵	n.n
SR-S3	4,8×10 ⁶	n.n	LV-S3	n.n	n.n
SR-S4	6,4×10 ⁵	2,6×10 ⁴	LV-S4	4,9×10 ⁵	n.n
Átlag	2,8×10 ⁶ ±2×10 ⁶	2,6×10 ⁴ ±1,4×10 ⁴	Átlag	6,5×10 ⁵ ±5,8×10 ⁵	n.m

n.n: nem fejlődtek ki telepek; n.m: nem meghatározható

A tenyésztés során a Laguna Santa Rosa mintákból összesen 53, a Laguna Verde mintákból 26 tiszta tenyészetet hoztunk létre és csoportosítottunk ARDRA módszerrel. A Laguna Verde medencéjéből 12, a Laguna Santa Rosa üledékéből 19 baktériumtörzs 16S rRNS gén bázissorozatát határoztuk meg.

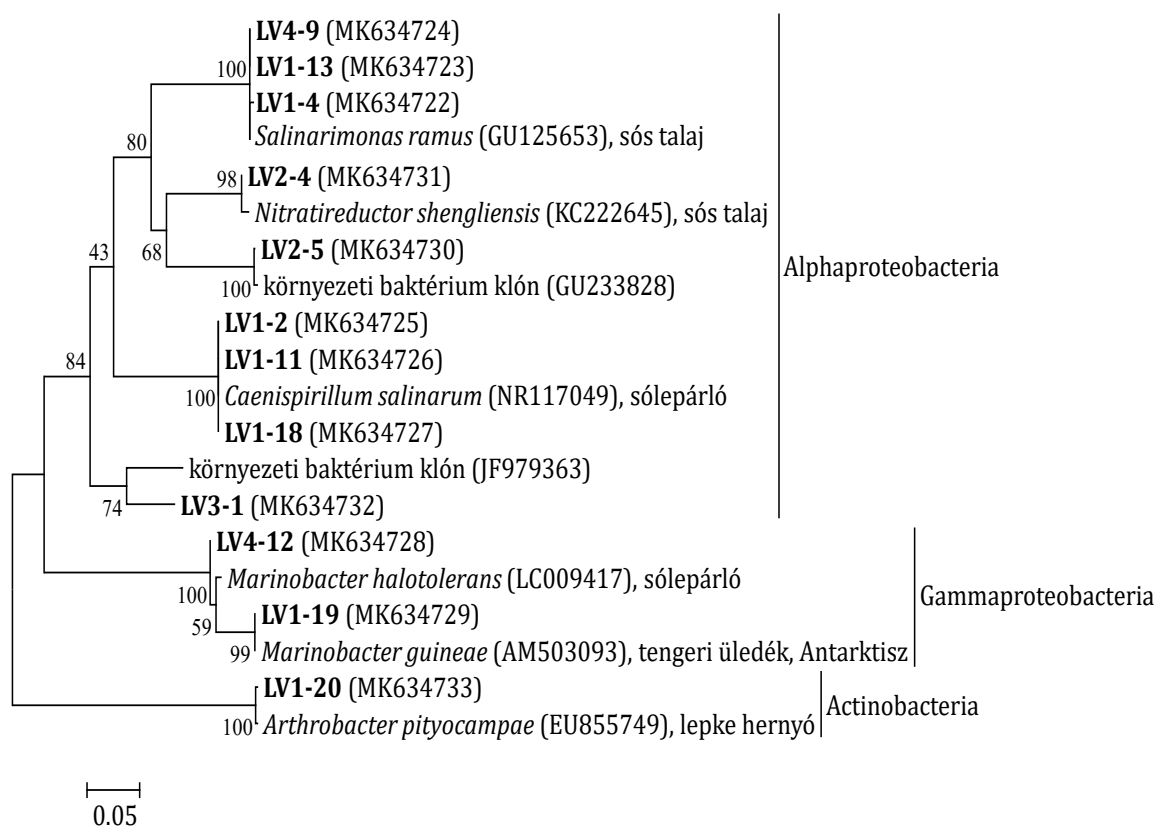
A két tó tenyészthető baktériumfajai között csak kevés egyezést találtunk (8. és 9. ábra). A Laguna Santa Rosa üledékéből összesen három törzs, a Proteobacteria, a Firmicutes és a Bacteroidetes képviselőit azonosítottuk. Itt a Bacteroidetes törzset a *Psychroflexus salinarum* képviselte, további három-három nemzetséget mutattunk ki a proteobaktériumok közül (*Halomonas*, *Idiomarina*, *Marinobacter*) és a Firmicutes

törzsből (*Jeotgalibacillus*, *Planococcus*, *Paraliobacillus*). A Laguna Verde bevonatából tenyésztésbe vontuk a Proteobacteria törzs hat nemzetségének tagjait (*Tistlia*, *Nitrateductor*, *Methyloligella*, *Marinobacter*, *Salinarimonas* és *Caenispirillum*), valamint az Actinobacteria törzs *Arthrobacter* nemzetségét, mely az 5.2. fejezetben tárgyalt permafrosztos tavi üledékekből létrehozott törzsgyűjteményekben is előfordult. A tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és a hozzájuk tartozó legközelebbi rokon fajok filogenetikai viszonyait az 8. és 9. ábra összegzi.



8. ábra A Laguna Santa Rosa üledékéből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai, valamint a legközelebbi rokon fajok típusfajának származási helye

Számos olyan baktériumfaj képviselőjét izoláltuk, melyeket korábban kimutattak már a Puna de Atacama-fennsík sós tavaihoz hasonló környezetek (pl. magashegyi sós tavak üledéke, tengeri üledékek, sós talajok, hipersalin tavak, sólepárlók, sós forrás) baktériumközösségeinek tenyésztéses vizsgálatakor (Martínez-Cánovas és mtsai, 2004, Bagheri és mtsai, 2013, Zhong és mtsai, 2015, Montes és mtsai, 2008, Chen és mtsai, 2009). A létrehozott törzsgyűjtemény tagjai között aerob és fakultatív anaerob anyagcserét folytató, jellemzően mezofil és neutrofil baktériumok fordultak elő. A Laguna Santa Rosa üledékéből izolált baktériumfajok közül irodalmi adatok alapján egy kivételével az összes tenyésztésbe vont faj képes 15% NaCl koncentrációt tolerálni.



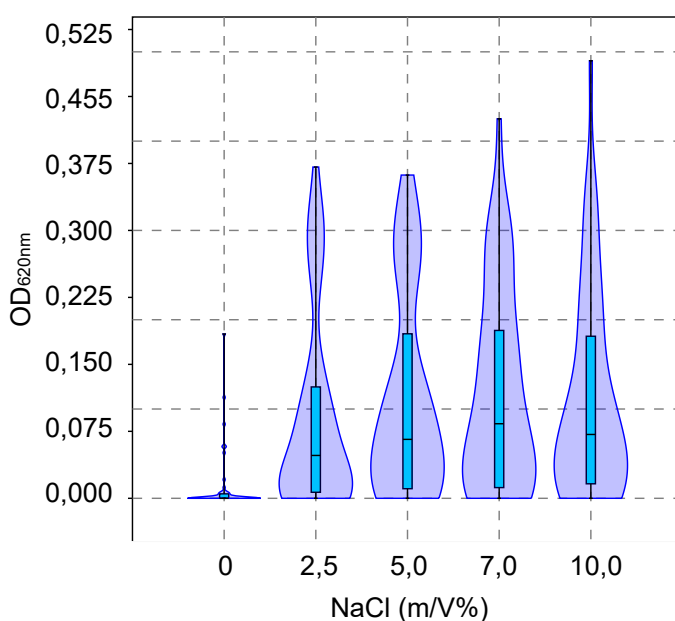
9. ábra A Laguna Verde melegvizes medencéjének mikrobiális bevonatából tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai, valamint a legközelebbi rokon fajok típus törzsének származási helye

A leggyakoribb nemzetség, a *Marinobacter* tagjai tengeri környezetből izolált mérsékelten halofil baktériumok (Montes és mtsai, 2008), közülük összesen hat faj képviselőit sikerült kimutatnunk a két tóból. Több fakultatív anaerob baktériumfaj képviselőjét is tenyésztésbe vontuk, ilyen például a *Halomonas alimentaria* vagy a mélyvörös telepeket képző *Salinarimonas ramus* (Yoon és mtsai, 2002, Cai és mtsai,

2011). Az obligát metilotróf fajokat magába foglaló *Methylobacillus* nemzetség (Doronina és mtsai, 2013) egy képviselőjét is tenyésztésbe vontuk a Laguna Verde bevonatából, ám ez a törzs nem volt besorolható a nemzetség egyetlen eddig ismert fajába sem. Érdekes megemlíteni, hogy a *Jeotgalibacillus marinus* nem csak a Száraz-Andok magashegyi sós tavaiban, hanem a Fertő nádasainak rizómájában is megtalálható volt (Borsodi és mtsai, 2005).

5.1.3 A sós tavakból tenyésztésbe vont baktériumtörzsek NaCl toleranciája

A két sós tóból létrehozott törzsgyűjtemény tagjait NaCl tolerancia teszteknek vetettük alá. A különböző NaCl koncentrációt tartalmazó táplevesekben mutatott növekedést két hét 20 °C-on történő inkubációt követően a táplevesben mért optikai denzitás változása alapján értékeltük.

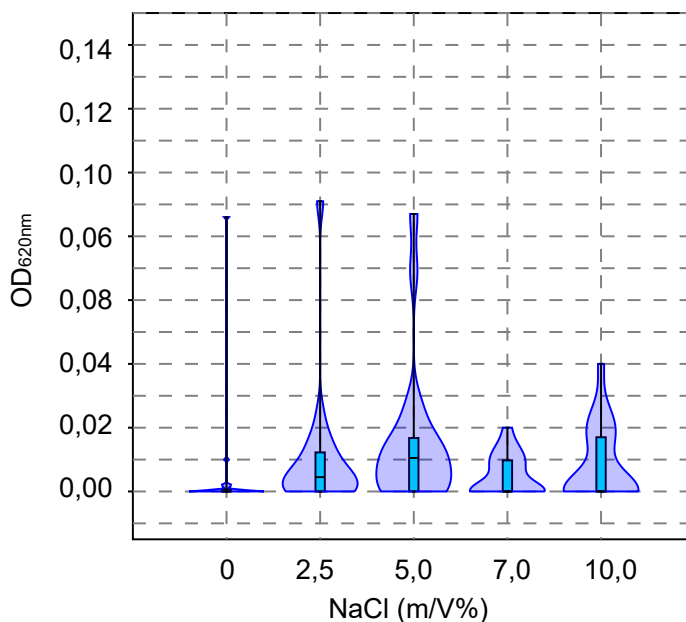


10. ábra A Laguna Santa Rosa üledékéből származó baktériumtörzsek NaCl tolerancia eredményei

A Laguna Santa Rosa esetében vizsgált 49 baktériumtörzs egyértelmű preferenciát mutatott a magasabb sókoncentrációk irányába (10. ábra). Legnagyobb mértékű OD változás az izoláláshoz használt táptalajnak megfelelő 7,0% (m/V) NaCl koncentráción volt megfigyelhető, egyes törzsek még a magasabb (10,0%) NaCl koncentrációt tartalmazó táplevesekben is jó növekedést mutattak, míg a legtöbb törzs NaCl jelenléte nélkül egyáltalán nem növekedett. Az eredmény összhangban áll a tenyésztésbe vont

törzsek azonosításának eredményével, hiszen az egyik leggyakoribb faj a *Marinobacter guineae* volt, mely akár 15% NaCl koncentráció mellett is képes növekedni, csakúgy, mint közeli rokona, a *Marinobacter halophilus* (Montes és mtsai, 2008, Zhong és mtsai, 2015).

A Laguna Verde bevonatából 20 tenyésztésbe vont baktériumtörzs NaCl toleranciáját vizsgáltunk meg (11. ábra), melyek 1-1 kivételtől eltekintve nem mutattak nagyobb fokú növekedést a magasabb (7,0-10,0%) sókoncentráción. Bár voltak olyan törzsek (*Arthrobacter* nemzetség tagjai) melyek a magasabb, 10%-os NaCl koncentrációt részesítették előnyben, a legtöbb törzs (*Tistlia*, *Caenispirillum*, *Methylogigella* nemzetség tagjai) inkább mérsékelt sótoleranciával bírt (2,5%, 5,0% NaCl). A Laguna Santa Rosa törzseihez hasonlóan itt sem volt számottevő növekedés NaCl jelenléte nélkül. A Laguna Verde esetében a vizsgált melegvizes medencét több melegvizes forrás is táplálja, melyeknek NaCl koncentrációja ismeretlen, azonban a befolyó vizek felelősek lehetnek a medence vizére jellemző NaCl koncentráció időbeli változásaiért. A sókoncentráció ingadozása lehetővé teszi, hogy egyazon mintában többféle NaCl optimummal jellemezhető baktérium forduljon elő. Bár az üledékek is heterogén környezetnek tekinthetők, a Laguna Santa Rosa állandóan sós környezete egyértelműen a halofil szervezeteknek kedvez. Ez utóbbit jelzi a tenyésztésbe vont baktériumtörzsek NaCl toleranciája.



11. ábra A Laguna Verde bevonatából származó baktériumtörzsek NaCl tolerancia eredményei

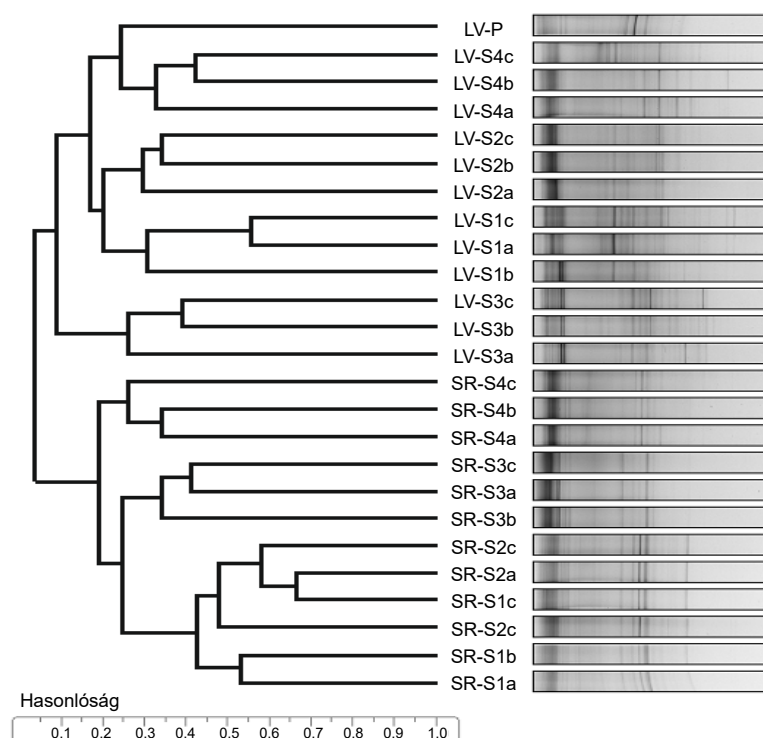
Általánosságban megállapítható, hogy a Laguna Verde bevonatából származó törzsek növekedése alulmaradt a Santa Rosa üledékéből tenyésztésbe vont izolátumokéhoz képest. Minden NaCl-t tartalmazó táplevesben alacsonyabb OD értéket mértünk a Laguna Verde törzsek esetében, mint a Laguna Santa Rosa törzseknél. Ez az eredmény a minta típusával magyarázható. A mikrobiális bevonatokban a mikroorganizmusok szintrofikus kapcsolataik révén stabil közösségeket hoznak létre, melyben az egyes taxonok anyagcseréjüket tekintve szoros függő kapcsolatban állnak egymással. Az egymás anyagcseretermékeit kölcsönösen hasznosító baktériumok kapcsolatát szintrófiának nevezzük, mely obligát mutualista kapcsolatként definiálható (Morris és mtsai, 2013). A tiszta tenyészetek izolálása során ezek a kapcsolatok megszűnnek, ami megnehezíti a törzsek fenntartását. A Laguna Verde törzsek növekedése nem csak a NaCl tolerancia teszteknél volt nehézkes, az izolálást követően a tiszta tenyészetek néhány átvétel után egyáltalán nem nőttek, vagy csak nagyon gyenge növekedést mutattak.

A két környezetből származó baktériumok NaCl toleranciájára jellemző különbségek tehát a környezet állandóságára, míg a vizsgált törzsek növekedési képessége a minták típusára (bevonat vagy üledék) vezethető vissza.

5.1.4 A sós tavakból származó minták DGGE vizsgálatának eredménye

A minták DGGE ujjlenyomatának összehasonlítása alapján elmondható, hogy az egyazon mintavételi helyről gyűjtött párhuzamos mintákra jellemző baktériumközösségek (két csoport kivételével) egymásra hasonlítottak a legjobban, hiszen külön csoportosultak az UPGMA hasonlósági dendrogramom (12. ábra). A DGGE során nyert adatok elemzésével kapott hasonlósági dendrogram megerősítette azt, hogy a vizsgált tavakra jellemző baktériumközösségek karakteresen különböztek egymástól. A Laguna Santa Rosa két tavi üledéke, az SR-S1 és az SR-S2 mintacsoportokra jellemző molekuláris ujjlenyomatok nagyfokú hasonlóságot mutattak, ez a két mintacsoport nem vált el teljesen egymástól, ami a két környezetre jellemző baktériumközösségek diverzitásának hasonlóságát tükrözi. A Laguna Verde medencéjéből négy helyről származó bevonatminta, valamint a vízminta közösségei szintén külön klaszterekbe rendeződtek.

A DGGE molekuláris ujjlenyomatok vizsgálata során kapott eredmény alátámasztja, hogy az egyes minták reprezentatívnak tekinthetők a vizsgált környezetekre nézve. A kapott adatok alapján az újgenerációs DNS szekvenálást ezért a vizsgálatba vont párhuzamos DNS izolátumokból létrehozott kompozit mintákon végeztük el.



12. ábra A Laguna Santa Rosa (SR) üledék- és a Laguna Verde (LV) bevonat- és vízmintákra jellemző DGGE molekuláris ujjlenyomatok alapján szerkesztett UPGMA hasonlósági dendrogram

5.1.5 A sós tavak baktériumközösségeinek összetétele újgenerációs DNS szekvenálással

A Laguna Santa Rosa és Laguna Verde baktériumközösségeinek vizsgálatakor összesen 9 minta újgenerációs DNS szekvenálását végeztük el, melynek eredményeként összesen 9 764 (mintánként 790-1628) szekvenciát kaptunk. A szekvenálás eredményét a 6. táblázat összegzi.

A Good's coverage index alapján a vizsgált szekvenciák száma elegendő volt a vizsgált baktériumközösségek összetételének megfelelő leírására (6. táblázat). A Shannon index és az inverz Simpson diverzitás alapján a baktériumközösségekre nagyobb diverzitás jellemző a Laguna Santa Rosa üledékében, mint a Laguna Verde bevonatában, ami egyaránt jelent több OTU-t és azok egyenletesebb eloszlását a vizsgált közösségben. A Laguna Santa Rosa üledékére jellemző nagyobb taxondiverzitás feltételezhetően a környezet alacsonyabb sókoncentrációjára vezethető vissza.

6. táblázat A Laguna Santa Rosa és Laguna Verde tavakból származó mintákból újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek főbb adatai és diverzitás indexei

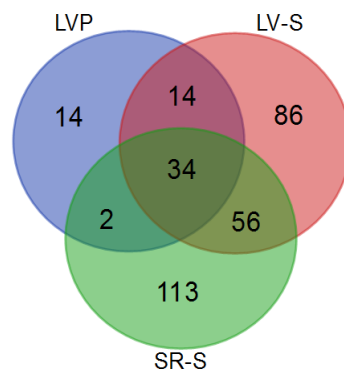
Minta	Törzsek száma	Nemzetségek száma	Sobs	Good's coverage	Shannon index	Inverz Simpson diverzitás
SR-S1	21	126	222	0,9	4,8	82,1
SR-S2	22	107	207	0,9	4,8	72,1
SR-S3	16	77	118	1,0	4,0	23,0
SR-S4	20	94	154	0,9	4,3	41,0
LV-S1	16	77	111	1,0	3,9	26,1
LV-S2	14	60	105	1,0	3,9	30,6
LV-S3	14	78	131	0,9	3,9	23,8
LV-S4	21	90	132	1,0	3,8	12,0
LVP	15	64	88	1,0	3,0	6,0

Az újgenerációs DNS szekvenálás során a vizsgált mintákban összesen 19 legalább 1%-os relatív abundanciával rendelkező törzs képviselőit azonosítottuk. Ezek az Actinobacteria, a Bacteroidetes, a Chlorobi, a Chloroflexi, a Cloacimonetes, a Cyanobacteria, a Deferribacteres, a Deinococcus-Thermus, a Firmicutes, a Gracilibacteria, a Latescibacteria, a Lentisphaerae, a Parcubacteria, a Planctomycetes, a Proteobacteria, a Saccharibacteria, a Spirochaetae, a Tenericutes és a Verrucomicrobia törzsek voltak.

Minden mintában nagy arányban mutattuk ki a Proteobacteria (Laguna Santa Rosa: 13,0-40,7%; Laguna Verde: 14,1-64,8%) és a Bacteroidetes (Laguna Santa Rosa: 37,5-51,5%; Laguna Verde: 16,1-34,8%) törzsek képviselőit, ami jellemző a (hiper)sós tavi környezetekre (Yang és mtsai, 2006). Azonban a vizsgált tavak baktériumközösségeiben a két törzs taxon-diverzitása és a jelenlévő taxonok relatív abundanciája jelentősen különbözött. További különbség volt a két tó között, hogy míg a Laguna Santa Rosa üledékében a Firmicutes törzs (1,0-28,2%), addig a Laguna Verde bevonatában a Cyanobacteria (3,8-18,1%), a Chloroflexi (0,5-14,2%) és a Parcubacteria (0,2-38,1%) törzsek voltak gyakoriak. Hasonlóság, hogy kisebb arányban, de az összes mintában kimutatható volt a Verrucomicrobia törzs (Laguna Santa Rosa: 0,6-2,8%; Laguna Verde: 0,3-5,4%).

Az azonosított OTU-k élőhely szerinti megoszlását a 13. ábra mutatja be. Látható, hogy egyaránt voltak kizárólag az adott tavi környezetben, valamint mindkét tóban előforduló OTU-k. Mindkét tó esetében igaz, hogy a kimutatott OTU-k több, mint fele kizárólag az adott élőhelyen volt jelen. Az összes detektált OTU 28%-a volt jelen mindkét tóban, 11%-a pedig mindhárom környezetben (víz, üledék, bevonat). A kizárólag csak az

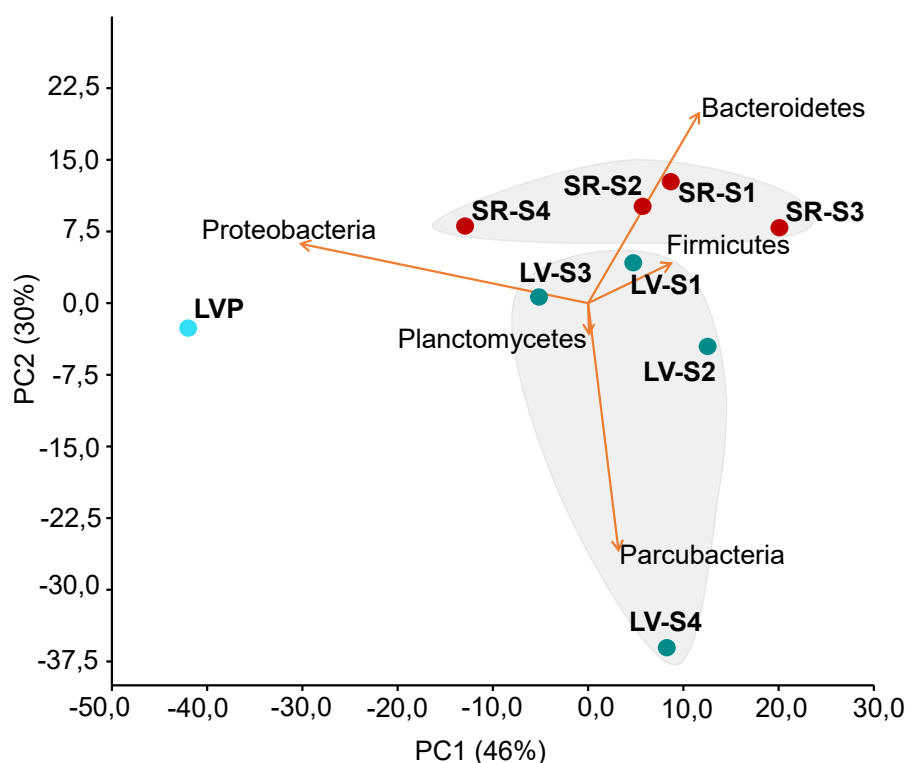
egyik tóra jellemző OTU-k aránya a Laguna Santa Rosa és a Laguna Verde esetében egyaránt 55% volt. A Laguna Verde környezetéből kimutatott OTU-k 8%-a volt kimutatható kizárólag a vízből, 69%-át pedig csak a bevonatokból azonosítottuk.



13. ábra Az Ion Torrent szekvenálás során kimutatott OTU-k (97%) megoszlása a Laguna Santa Rosa üledéke (SR-S) valamint a Laguna Verde vize (LVP) és bevonata (LV-S) között

A feltárt közösségek törzs szintű összehasonlítását főkomponens-analízissel (PCA) végeztük el (14. ábra). A létrehozott biplot ábrán a detektált filogenetikai törzsek szolgáltak változókként. Az első két főkomponens a különbségek 76%-át fedte le, aminek köszönhetően a két tó mintái jól elkülönültek egymástól. A biplotból látható, hogy a minták közötti varianciáért négy taxon (Bacteroidetes, Proteobacteria, Parcubacteria, Firmicutes) a felelős.

Az első főkomponens mentén a Laguna Verde vízmintájára jellemző közösség elkülönült az üledék- és bevonatmintáktól. A Laguna Santa Rosa tóból leírt baktériumközösségek között szintén nagy különbség volt az első főkomponens mentén, ami jelzi, hogy a vizsgált közösségek varianciájához főként a Proteobacteria és kisebb részben Firmicutes törzs járult hozzá. A Laguna Verde bevonatainak közösségei főként a második főkomponens mentén váltak szét, ahol elsősorban a Parcubacteria és a Bacteroidetes törzsek járultak hozzá a varianciához. A főkomponens analízis megmutatta, hogy a két tóból származó közösségek összetételének változatosságát mintatípusonként eltérő taxonok okozzák.

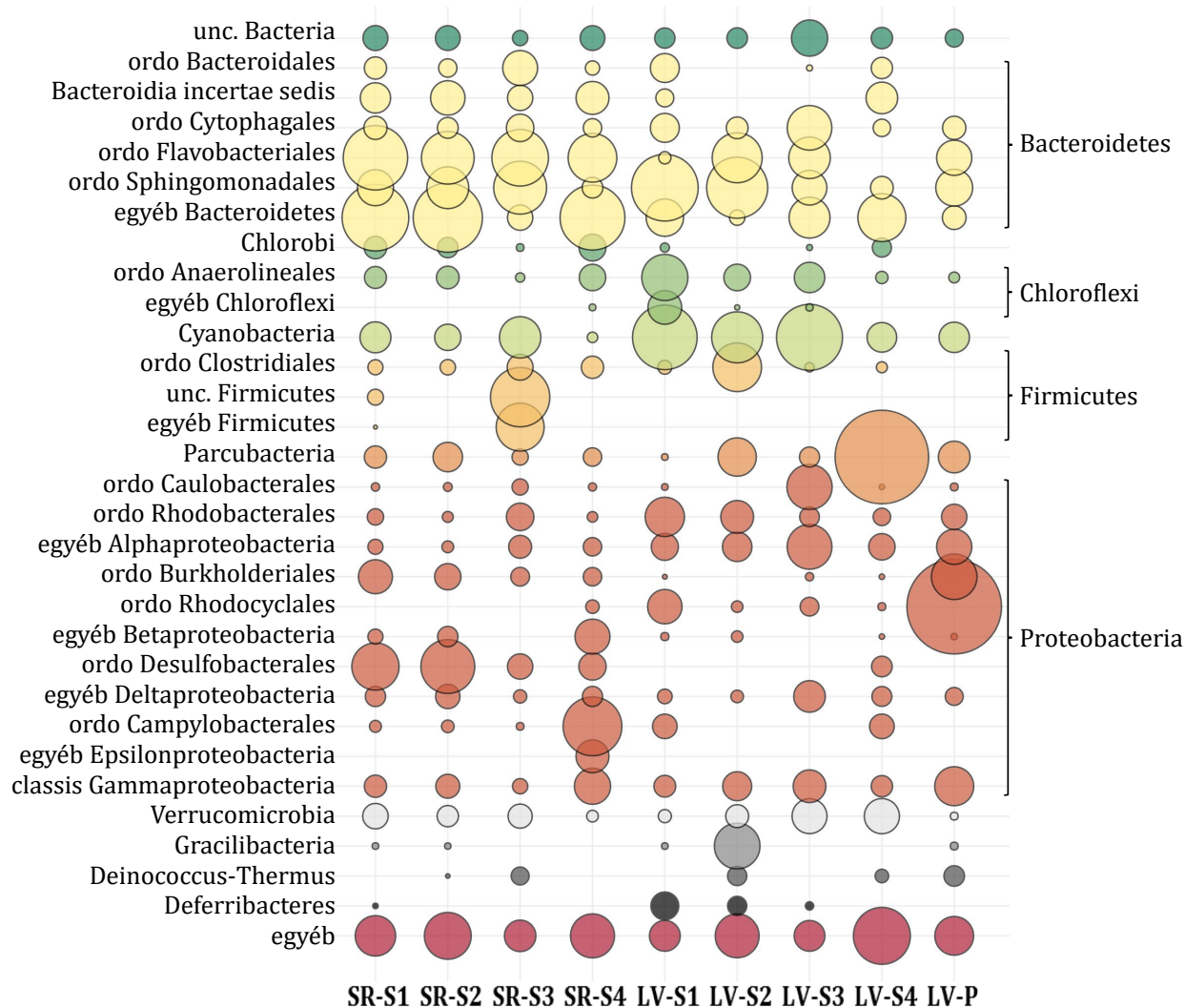


14. ábra A Laguna Santa Rosa és Laguna Verde baktériumközösségeinek szerkezete közötti összefüggés ábrázolása főkomponensek mentén, valamint a közösségszerkezetek közötti különbségekre legnagyobb befolyással bíró filogenetikai törzsek korrelációja

Az egyes mintákból újgenerációs DNS szekvenálással minimum 1% relatív abundanciában kimutatott rendeket, osztályokat vagy törzseket és azok megoszlását az 15. ábra összegzi.

A Laguna Santa Rosa tavi üledékében a Proteobacteria törzsből a Deltaproteobacteria (túlnyomó többségben a Desulfobacterales rend tagjai), a vizenyős tóparti régió üledékében pedig az Alphaproteobacteria (SR-S3) és a Gammaproteobacteria (SR-S4) volt a leggyakoribb osztály. Négy törzs jelenlétét (Tenericutes, Spirochaetae, Cloacimonetes, Actinobacteria) kizárólag ebből a tóból mutattuk ki. Érdekesség, hogy a tenyésztési vizsgálatok során nagy arányban azonosítottuk az Actinobacteria törzs képviselőit, azonban a szekvenálással feltárt közösségekben 1%-nál nagyobb relatív abundanciával csak az SR-S3 és SR-S4 mintákban voltak jelen. A 3770 m tszf magasságon fekvő sós tó baktériumközösségét a Bacteroidetes törzs képviselőinek nagyfokú taxon-diverzitása jellemezte, főként a Flavobacteriales rend és a Bacteroidia képviselőit azonosítottuk. A Laguna Santa Rosa üledékében a kimutatott baktériumközösségek összetétele az SR-S1 és SR-S2 minták esetében nagyfokú

hasonlóságot mutatott, a domináns taxonok többnyire megegyeztek, és inkább a kevésbé abundáns törzsek arányai között volt különbség. A két mintára jellemző nagyfokú hasonlóság már a DGGE molekuláris ujjlenyomat alapján létrehozott dendrogramon is látható volt. Az SR-S3 és SR-S4 minták több filogenetikai csoport tekintetében is különböztek a másik két mintától, de egymásra is kevésbé hasonlítottak. A Laguna Santa Rosa üledékekre jellemző volt a Bacteroidetes és Firmicutes törzsek nagy abundanciája (38-51% és 2-28%), valamint az egyes mintákban az Epsilonproteobacteria (SR-S4, 19%) és Deltaproteobacteria (SR-S2, 15%) osztály kiugróan magas aránya.



15. ábra A Laguna Santa Rosa (SR) üledékére és a Laguna Verde (LV) bevonatára jellemző baktériumközösségek IonTorrent újgenerációs DNS ampikon szekvenálással feltárt diverzitása

(A különböző mintákban kimutatott taxonok jelenlétét az adott taxon relatív abundanciájával arányos átmérőjű körök jelzik.)

A Laguna Verde bevonatában a már említett abundáns törzsek (Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Chloroflexi, Parcubacteria) mellett négy olyan, kevésbé abundáns törzs volt, mely kizárólag ebben a tóban fordult elő. A vízmintában (LVP) a Saccharibacteria (3,0%), a bevonatban Gracilibacteria (0,2-9,0%), a Latescibacteria (1,8%) és a Deferribacteres (0,3-3,4%) jelenlétét mutattuk ki. A tó melegvizes medencéjében a Bacteroidetes törzs képviselői közül a legnagyobb arányban négy rend (Cytophagales, Bacteroidales, Flavobacteriales és Sphingobacteriales) tagjait mutattuk ki, köztük több olyan kandidátus taxont, melyek képviselőit ezidáig még nem vonták tenyésztésbe. A Proteobacteria törzsből a bevonatmintákban az Alphaproteobacteria osztály képviselői voltak dominánsak, de minden mintában jelen volt a Deltaproteobacteria és a Gammaproteobacteria osztály, két mintában pedig az Epsilonproteobacteria néhány képviselőjét is kimutattuk. A Laguna Verde vizéből (LVP) feltárt baktériumközösségekben a Proteobacteria törzsbe tartozó Rhodocyclales rend (Betaproteobacteria) nagyfokú dominanciáját mutattuk ki. Az üledékekhez képest a Bacteroidetes és Parcubacteria törzsek aránya kisebb volt, mások (Firmicutes, Chlorobi) egyáltalán nem voltak jelen a vízben.

A Laguna Verde vizében összesen 16 olyan OTU-t mutattunk ki, melyek a biofilmben nem voltak jelen (13. ábra), köztük olyan nemzetségek tartoztak, mint a jellemzően (édes- vagy sós-) vizekben előforduló *Fluviicola*, *Rheinheimera* vagy *Parvibaculum*, de megtalálhatók korábban vízből és biofilmekből is izolált taxonok, például a *Delftia* is (O'Sullivan és mtsai, 2005, Brettar és mtsai, 2002, Schleheck és mtsai, 2004, Wen és mtsai, 1999). Annak ellenére tehát, hogy nem hagyományos vízmintát vizsgáltunk (hiszen a purhab felszínén lehetséges a biofilmképződés az inkubációs idő alatt), a minta lehetővé tette, hogy a víz baktériumközösségeinek alkotóit is megismerjük.

5.1.6 A sós tavak baktériumközösségeinek összevetése hasonló élőhelyek diverzitásával

Egy, az Atacama-sivatag több sós tavának (köztük a 3700 m tszf magasságon fekvő Salar de Coposa és a 4500 m tszf magasságon található Salar de Puja) üledékét és mikrobiológiai bevonatát vizsgáló kutatás a Laguna Santa Rosa üledékére és a Laguna Verde bevonatára jellemzőkhöz hasonló baktériumközösségeket tárt fel (Rasuk és mtsai, 2014). Az általuk leírt meglehetősen diverz közösségek fő alkotói a Proteobacteria és a Bacteroidetes törzseken kívül a Deinococcus-Thermus, az Actinobacteria, a Verrucomicrobia, a Chlorobi, a Chlofolexi, az Acidobacteria képviselői voltak. A nagy

diverzitást a környezet kedvező fizikai-kémiai paramétereinek tulajdonították (ezekben a tavakban magasabb foszfor tartalmat és oldott oxigén értéket mértek, mint az Atacama-sivatag sós síkságain).

A Száraz-Andok magashegyi sós tavai közül az Argentínában található Socompa-tó esetében modern sztromatolitok jelenlétéről számoltak be. A többségében kovamoszatok által alkotott közösségekre az egyéb jelenkori sztromatolitokhoz képest nem szokványos baktériumcsoportok voltak dominánsak (Farías és mtsai, 2013). A Laguna Verde és Laguna Santa Rosa bevonatában is előfordultak ezek a taxonok (*Deinococcus-Thermus*, *Rhodobacteraceae*, *Desulfobacterales*), de nem voltak domináns közösségalkotók.

A Laguna Verde bevonatában a fototróf csoportok (*Cyanobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*) nagyobb arányt képviseltek, mint a Laguna Santa Rosa üledékében. Korábbi kutatások eredményei azt tükrözik, hogy sem az Atacama-sivatag belső legszárazabb részén, sem a Száraz-Andok magashegyi sivatagában található permafrosztos területeken (Solon és mtsai, 2018) nem abundánsak a cianobaktériumok. Ezzel szemben a permafroszt határ alatt fekvő magashegyi sós tavakban nagyobb arányban fordul elő a csoport, ami feltételezhetően a magasabb hőmérsékletnek köszönhető. Rasuk és mtsai (2014) a Száraz-Andokban található két tó, a 4500 m tszf magasságon fekvő Salar de Puja és a 3700 m tszf magasságon található Salar de Coposa üledékéből is nagy relatív abundanciával mutatták ki a törzs egyes tagjait, csakúgy, mind Dorador és mtsai (2008) a Salar de Huasco nemzeti park (3800 m tszf) vizes élőhelyein.

A Puna de Atacama tavai közül a Laguna Santa Rosa üledékéből 2014-ben vett mintákból 16S rRNS klóntárakkal detektáltuk a *Parcubacteria* képviselőit (Aszalós és mtsai, 2016). A törzs tagjait leggyakrabban anaerob környezetekből mutatták ki, ahol üledékekben részt vehetnek a hidrogén- és kénciklusban (Nelson és Stegen, 2015). Bizonyos, eddig ismeretlen körülmények hatására relatív abundanciájuk nagy mértékben megnőhet, ezeket az időszakos ún. *Parcubacteria* virágzásokat felszín alatti oligotróf rétegvizekben mutatták ki (Lin és mtsai, 2012). Lehetséges, hogy egy hasonló elszaporodásnak köszönhető az LV-S4 mintában a filogenetikai törzsre jellemző kiugróan magas relatív abundancia. A csoport nagyon változatos környezetekben fordul elő, a Száraz-Andok sós tavaihoz hasonló helyekről is sok esetben kimutatták jelenlétüket. Az argentin Andokban 3570 m tengerszint feletti magasságon fekvő Socompa-tóban modern kori sztromatolitok - infravörös domináns sugárzással és alacsony oxigén koncentrációval jellemezhető - középső rétegéből kb 1% relatív abundanciával fordultak elő (Toneatti és

mtsai, 2017). Más Atacama-sivatagi sós környezetekből is kimutatták, például a Salar de Llamara sóközeteinek környezetében, ahol az egyébként a közösség minor csoportját alkotó *Parcubacteria* relatív abundanciája a téli időszakban megnőtt (Rasuk és mtsai, 2014). A tenyésztésbe még nem vont törzs képviselői előfordultak a Tibeti-fennsík sós tavaiban, például a Chaka-tóban is (Jiang és mtsai, 2010).

Lara és mtsai (2012) dúsító tenyészetek létrehozásával arzén rezisztens baktériumok közösségeit vizsgálták Észak-Chile sós üledékéből (Salar de Ascotán, Salar de Atacama). Számos olyan baktérium nemzetség jelenlétét mutatták ki, amelyeket vagy tenyésztéses (*Paraliobacillus* sp, *Halomonas* sp, *Marinobacter* sp) vagy szekvenálásos (*Arcobacter*, Epsilonproteobacteria, Clostridiales, Burkholderiales, Rhodobacterales) eljárással a Laguna Verde és Laguna Santa Rosa bevonatából is kimutattunk.

A Tibeti-fennsík magashegyi tavaira jellemző baktériumközösségekben is hasonló filogenetikai törzsek képviselői voltak dominánsak. Egy átfogó vizsgálat, mely a fennsík édesvízi tavainak üledékét vizsgálta (Zhang és mtsai, 2015) azt találta, hogy az üledék oldott szerves szén és teljes nitrogén tartalma határozta meg elsősorban a baktériumok abundanciáját, míg a nitrát jelenléte elsősorban a diverzitásra volt hatással. A leggyakoribb közösségalkotó a Proteobacteria volt, azonban nagy különbség, hogy a Gammaproteobacteria osztály sokkal nagyobb arányban fordult elő, mint a Puna de Atacama-fennsík sós tavainak üledékében. A Bacteroidetes, bár jelen volt ezekben a tavakban, mégsem képezett domináns csoportot, a Chloroflexi pedig a legtöbb vizsgált tó esetében jóval nagyobb abundanciával volt jelen, mint a Cyanobacteria. Ezek a különbségek a Tibeti-fennsík sós tavai esetében már nem álltak fenn, a Proteobacteria osztályai közül az Alpha- és Betaproteobacteria volt 16S rRNS gén klóntárakkal kimutatható, és a Bacteroidetes mellett az Actinobacteria törzs is domináns volt (Liu és mtsai, 2013).

5.1.7 A sós tavak baktériumközösségeinek potenciális anyagcsere diverzitása

Bár a baktériumközösségek biogeokémiai folyamatokban betöltött szerepének pontos feltárására további vizsgálatok lennének szükségesek, a taxonómiai diverzitás alapján következtetni lehet az adott közösségek lehetséges anyagcsere diverzitására. A két vizsgált sós tó környezetéből feltárt baktériumközösségeket változatos anyagcserére képes taxonok alkották: kemoorganotróf, kemolitoheterotróf, kemolitoautotróf vagy fotoautotróf anyagcserével jellemezhető baktérium nemzetségeket, kén, tioszulfát, ferrovas, hidrogén

oxidálására, nitrát, szulfát redukálására, nitrogén-fixációra, metilotrófiára képes szervezeteket mutattunk ki. A feltárt közösségekben a Laguna Verde esetében nagy arányban voltak jelen biofilmképzésben szerepet játszó nemzetségek tagjai, a Laguna Santa Rosa üledékében pedig nagy számban fordultak elő anaerob anyagcserét folytató baktériumok.

Az Epsilonproteobacteria képviselői változatos környezetekben fordulnak elő, ismertek patogén és kommenzalista fajai is, mások gyakoriak mélytengeri füstölgők környezetében (Moussard és mtsai, 2006), barlangi szulfidos forrásokban (Engel és mtsai, 2003) vagy szulfidos felszíni vizekben (Grote és mtsai, 2008). A Laguna Santa Rosa üledékéből a Helicobacteraceae család két nemzetségét (*Sulfurimonas*, *Sulfurovum*), valamint egy ezidáig tenyésztésbe nem vont nemzetség tagjait mutattuk ki. A kemolitoautotróf, elemi kén- és tioszulfát oxidálására képes baktériumokat a Japán tenger hidrotermális üledékeiből vonták először tenyésztésbe. A szénforrásként CO₂-t hasznosító *Sulfurimonas* nemzetségbe mezofil aerob szervezetek tartoznak, növekedésükhöz sós környezetre van szükség (Inagaki és mtsai, 2003). A *Sulfurovum* nemzetség tagjai fakultatív anaerob, mezofil szervezetek, az oxigénen kívül nitrátot is képesek elektronakceptorként felhasználni (Inagaki és mtsai, 2004).

A Laguna Verde bevonatában (LV-S4) gyakori volt az *Arcobacter* nemzetség, melyet változatos élőhelyeken, például kénes mélytengeri füstölgők környezetében, mint domináns közösségalkotót mutatták ki (Moussard és mtsai, 2006). Az *Arcobacter* nemzetség egyes tagjai nitrogén-fixációra, mások kén-oxidációra képesek, a nemzetségnek előfordulnak mikroaerofil képviselői is. Számos egyéb sós környezetben (pl sólepárlókban) is megtalálhatóak. Az *Arcobacter* nemzetség tagjai nagy tömegben vastag bevonatot képesek létrehozni. Moussard és mtsai (2006) egy mélytengeri füstölgő vizsgálatokor kihelyezett mintavevőn 5 nap leforgása alatt figyelte meg biofilm képződését. A nyálka mátrixba ágyazódó sejtek diverzitásának 16S rRNS gén klóntárakkal történő elemzésekor kiderült, hogy a biofilmet alkotó közösség összes tagja az Epsilonproteobacteria osztályba sorolható, túlnyomó többségük pedig az *Arcobacter* nemzetség tagja. Kisebb arányban a Helicobacteraceae család tagjait is detektálták (Moussard és mtsai, 2006), melyek a korábban említett SR-S4 mintában voltak gyakoriak.

A Laguna Verde vizéből (LVP) kifejezetten biofilmképzésben szerepet játszó taxonokat nem (*Arcobacter*), vagy csak jóval kisebb arányban (Rhodobacterales) mutattunk ki, mint a bevonatokból. A vízben legnagyobb arányban a Rhodocyclales rendbe tartozó metilotróf *Methyloversatilis* nemzetség volt jelen, mely nem jellemző

biofilmalkotó faj (Kalyuzhnaya és mtsai, 2006). A nemzetség első ismert fajának típustörzsét tavi üledék felszínéről vonták tenyésztésbe, így nem zárható ki, hogy nem a vízben, hanem az üledék felszínén él.

Az Alphaproteobacteria osztály különösen a Laguna Verde bevonatában volt abundáns. A Rhodobacterales rend minden mintában (a Laguna Santa Rosa üledékeiben is) előfordult. A rend képviselőit tengeri környezetekben a felszínek gyors, primer kolonizálójaként ismerik. Számos nemzetsége (pl. *Roseobacter*) tengeri bevonatok baktériumközösségeire jellemző faj (Dang és mtsai, 2008). Gyakori előfordulásuk arra utal, hogy szerepük lehet a Puna de Atacama-fennsík sós tavaiban a mikrobiológiai bevonatok képződésében. Az LV-S3 mintában az alphaproteobaktériumok között domináns *Glycoaulis* nemzetség típusfaját a kanadai Vancouver sziget közelében egy mélytengeri füstölő környezetéből vonták először tenyésztésbe. A szigorúan aerob, kemoorganotróf baktérium növekedési optimuma 30 °C körül van, NaCl jelenlétét igényli a növekedéshez, és 1 m/V% szerves anyag tartalom felett sejtjei eldeformálódnak, akár az osztódásuk is megszűnhet (Abraham és mtsai, 2013). A *Porphyrobacter* nemzetség, mely szintén megtalálható volt az LV-S3 bevonatmintában, a *Glycoaulis* nemzetség tagjaihoz hasonlóan aerob kemoorganotróf baktériumok csoportja, és mindkét nemzetség képviselői csőszerű vázat képesek létrehozni (Fuerst és mtsai., 1993). A *Porphyrobacter* tagjairól ismert, hogy bakterioklorofillt képesek előállítani, sejtjeik narancssárga vagy piros színűek. Szintén ebben a mintában volt jellemző a *Ferrovibrio* jelenléte. A nemzetség első ismert képviselőjét egy alacsony sótartalmú forrásból írták le Oroszország krasznodári határterületén (Sorokina és mtsai, 2012), de változatos környezetekből izolálták, például a budai Gellért gyógyfürdő termálvizéből is (Szuróczki és mtsai, 2016). A neutrofil vas-oxidáló baktérium organotróf litheterotróf és mixotróf növekedésre képes, ferrovasat használva elektrondonorként (Sorokina és mtsai, 2012).

A Deltaproteobacteria tagjai főként a Laguna Santa Rosa üledékében voltak gyakoriak, kisebb arányban a Laguna Verde egy-egy mintájában is előfordultak. Az ebbe az osztályba tartozó szulfátredukáló baktériumok (SRB) több csoportját kimutattuk a Laguna Santa Rosa üledékéből. Az obligát anaerob csoport tagjai közül legnagyobb arányban a *Desulfosarcina* és a *Desulfobulbus* nemzetséget azonosítottuk. Ezeken kívül előfordultak még a *Desulfomicrobium*, a *Desulfocapsa* és a *Desulfonatronobacter* nemzetség tagjai. Érdekes, hogy a Laguna Verde mintákban jóval kisebb volt a SRB-k diverzitása, egy csoport, a *Desulfovibrio* azonban viszonylag nagy arányban volt detektálható az egyik (LV-S3) mintából.

A Betaproteobacteria osztály képviselői a Laguna Santa Rosa üledékében és a Laguna Verde bevonatában egyaránt előfordultak. A Laguna Santa Rosa mintákban a *Thiobacillus*, a *Hydrogenophaga* (SR-S1) és egy ezidáig tenyésztésbe nem vont nemzetség fordult elő. A *Thiobacillus* nemzetségbe tartozó mindhárom baktériumfaj obligát kemolitoautotróf, melyek redukált kénvegyületeket és elemi ként képesek energiaforrásként hasznosítani (Boden és mtsai, 2017). A *Hydrogenophaga* nemzetségbe sárga pigmentáltságú, hidrogén-oxidáló, kemolitoautotróf vagy kemoorganotróf baktériumok tartoznak, melyek fenotípusosan a *Pseudomonas* nemzetség tagjaival mutatnak nagyfokú hasonlóságot (Willems és mtsai, 1989). A Laguna Verde vizében a Betaproteobacteria osztály képviselői közül a *Hydrogenophaga* nemzetség tagjaihoz hasonlóságot mutató szekvenciák mellett a Rhodocyclales rend képviselőit (főként ezidáig tenyésztésbe nem vont baktériumokra utaló szekvenciákat) mutattunk ki. A Rhodocyclales rend három családjába változatos anyagcserét folytató baktériumfajok tartoznak. Előfordulnak közöttük anaerob fotoheterotróf, N₂-fixációra képes aerob szervezetek, metilotróf vagy kén-oxidáló baktériumok is (Oren, 2014). Annak feltárására, hogy ez a csoport milyen szerepet tölthet be a Laguna Verde melegvizes medencéjének vizében, további vizsgálatok szükségesek.

A Bacteroidetes törzsbe tartozó Flavobacteriales rend tagjai gyakran előfordulnak tengeri, brakk, édesvízi élőhelyek baktériumközösségeiben, nem csak mérsékelt és trópusi, de poláris területeken is. A szigorúan aerob vagy fakultatív anaerob baktériumok kemoorganotróf anyagcserét folytatnak, a csoport számos képviselője növekedéséhez igényli a környezetben a NaCl vagy tengeri sók jelenlétét (Bernardet, 2011). A törzs esetében jellemző volt az a szélsőséges környezetek esetében gyakori jelenség, hogy számos detektált szekvencia ezidáig tenyésztésbe nem vont baktériumfajjal mutatott nagyfokú hasonlóságot. A tenyésztési eredményekkel összevetve az NGS során kapott Bacteroidetes diverzitást elmondható, hogy mindössze egy képviselőjüket, a *Psychroflexus salinarum* baktériumot vontuk tenyésztésbe.

A Parcubacteria, eddig kizárólag molekuláris (metagenomikai, egy-sejt szekvenálás stb) eljárásokkal vizsgálható, tenyésztésbe nem vont filogenetikai törzs képviselői redukált genomjuk alapján feltételezhetően (ekto)parazita vagy szimbionta életmódot folytatnak, hiszen kofaktorok, aminosavak, zsírsavak és nukleotidok szintéziséhez szükséges génekkel egyáltalán nem, vagy csak nagyon kis arányban rendelkeznek, míg viszonylag diverz a sejt-sejt kapcsolatokban és adhézióban szerepet játszó génkészletük (Nelson és Stegen, 2015).

5.2 Baktériumközösségek diverzitása az Ojos del Salado olvadéktavának környezetében

5.2.1 Az olvadéktó vizének fizikai és kémiai paraméterei

Az Ojos del Salado permafroszt olvadása révén keletkező tavából származó vízminta (W1) abiotikus jellemzőinek vizsgálata során összesen 10 paramétert határoztunk meg laboratóriumi mérésekkel, melyek eredményét a 7. táblázat összegzi.

7. táblázat Az Ojos del Salado vulkánon 5900 m tszf magasságon fekvő olvadéktó vizének fizikai és kémiai paraméterei

	W1
pH	8,67
Hőmérséklet (°C)	9,2
Fajlagos vez. kép. (μS/cm)	1081
NH ₄ ⁺ (mg/l)	0,05
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0,14
NO ₃ ⁻ (mg/l)	16,3
PO ₄ ³⁻ (mg/l)	<0,01
Fe (mg/l)	<0,01
SO ₄ ²⁻ (mg/l)	550
IC (mg/l)	3,76
TOC (mg/l)	8,79
TN (mg/l)	2,31

A vízmintát az üledékmintákkal azonos időpontban vettük, így az tükrözi a mintavételkor jellemző fizikai-kémiai állapotot. A helyszíni mérés alapján az 5900 m tszf magasságban fekvő tó vizének hőmérséklete 8,9 °C volt, kémhatása pH 8,67 volt.

5.2.2 Az olvadéktavi üledékminták tenyésztési vizsgálatának eredménye

Az olvadéktó üledékéből kétféle táptalajon (R2A, PYG) történő tenyésztés során végzett csíraszámbecslés megmutatta, hogy az alacsony tápanyagtartalmú R2A táptalajon átlagosan egy nagyságrenddel nagyobb volt a tenyészthető telepképző egységek száma, ami a környezetben az alacsony tápanyagtartalmat előnyben részesítő szervezetek jelenlétét feltételezi. A vizsgált hat üledékminta becsült TKE g⁻¹ értékeit a 8. táblázat összegzi.

8. táblázat Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékében található baktériumközösségek R2A és PYG táptalajon meghatározott becsült csíraszám (telepképző egység grammonként, TKE g⁻¹, n.n.: nem fejlődtek telepek)

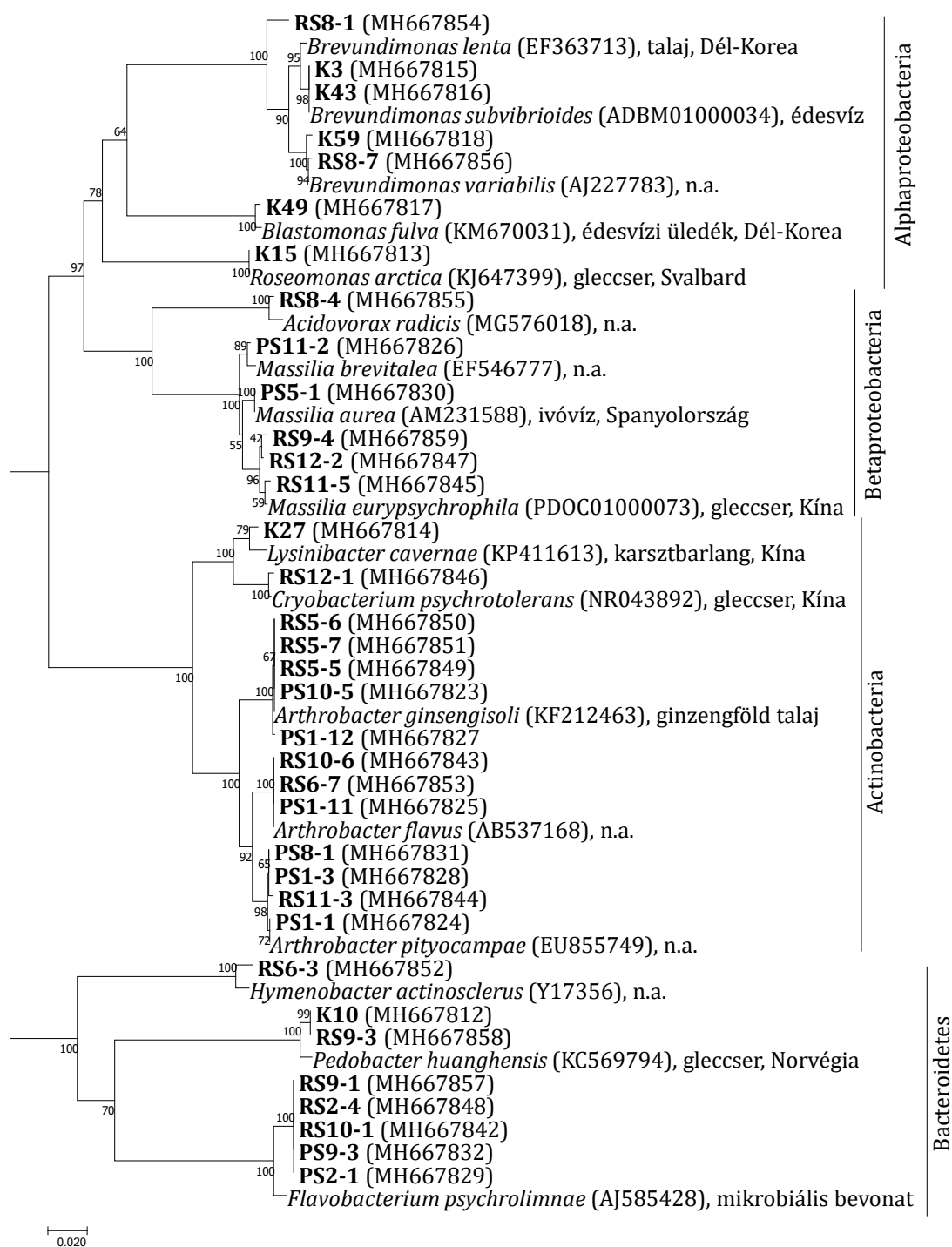
Minta kódja	R2A	PYG
S7	3,4×10 ⁵	6,5×10 ⁴
S8	2,2×10 ⁴	n.n.
S9	5,1×10 ⁴	1,5×10 ³
S10	1,6×10 ⁵	4,4×10 ⁴
S11	1,8×10 ⁵	1,6×10 ⁴
S12	8,5×10 ⁴	1,6×10 ⁴

A csíraszámbeecslés eredményei összhangban állnak más permafroszt környezetekben kimutatott aerob heterotróf baktériumok tenyésztethető csíraszámával. Permafroszt által befolyásolt környezetekben (pl. poláris permafroszt üledékekben) 10²-10⁸ maximális TKE g⁻¹, egyéb, fagy által befolyásolt környezetekben (pl. gleccserjég, tengeri üledék, arktiszi tengeri jég, antarktiszi tavak) hasonlóan széles skálán mozgó, 10²-10¹⁰ TKE g⁻¹ volt kimutatható (Steven és mtsai, 2007). Az olvadéktó üledékének vizsgálata során kapott eredmény megmutatta, hogy a választott táptalaj jelentős hatással volt a becsült csíraszámra. Az alkalmazott táptalaj a tenyésztethető diverzitásra is hatással volt: a R2A táptalaj alkalmazásával több nemzetség képviselőjét vontuk tenyésztésbe (16. ábra), ami megerősíti, hogy az általunk vizsgált baktériumközösség tagjai előnyben részesítik az alacsony tápanyagtartalmú környezetet. A két táptalaj alkalmazásával összesen 17 baktériumfajt sikerült tenyésztésbe vonni, melyek közel felét (47%) csak az R2A, 17%-át pedig csak a PYG táptalajról izoláltuk.

Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékéből egy 125 tagú törzsgyűjteményt hoztunk létre, az egyes baktériumtörzseket ARDRA elemzéssel csoportosítottuk. Az ARDRA csoportok egy-egy reprezentatív tagjának filogenetikai hovatartozását a legközelebbi rokon baktériumfajokkal az 16. ábrán látható neighbor-joining törzsfajfogalja össze.

A vizsgált izolátumok a Proteobacteria, a Bacteroidetes és az Actinobacteria törzsek képviselői voltak, melyek a permafroszt környezetekben leggyakrabban előforduló tenyésztethető taxonok. Bár az általunk vizsgált mintákból nem mutattuk ki, a Firmicutes törzs képviselőit is gyakran vonják tenyésztésbe permafrosztos területek vizsgálata során (Jansson és Tas, 2014).

Összesen 11 nemzetség (*Brevundimonas*, *Blastomonas*, *Roseomonas*, *Arthrobacter*, *Acidovorax*, *Massilia*, *Lysinibacter*, *Cryobacterium*, *Hymenobacter*, *Pedobacter* és *Flavobacterium*) képviselőit azonosítottuk.



16. ábra Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetéből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai, valamint a legközelebbi rokon fajok típusörzsének származási helye

A vizsgált baktériumtörzsek nagy része alacsony szerves anyag koncentrációval jellemezhető környezetekből leírt baktériumfajba tartozott, melyek típusörzszeit többek között karsztbarlangokból (*Lysinibacter cavernae*), édesvízből (*Brevundimonas*

subvibrioides), ivóvízből (*Massilia aurea*) vagy gleccserek tápanyagszegény környezeteiből (*Pedobacter huanghensis*, *Cryobacterium psychrotolerans*, *Massilia eurypsychrophila*) vonták tenyésztésbe (Qiu és mtsai, 2014, Zhang és mtsai, 2007a, Shen és mtsai, 2015).

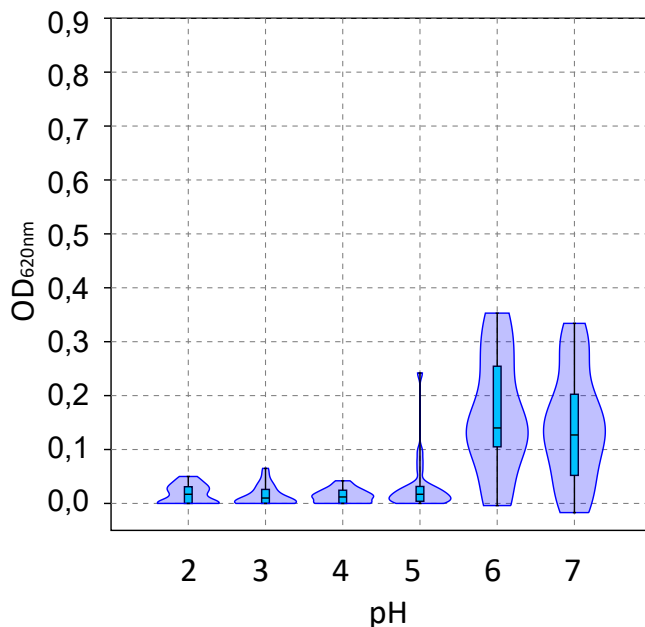
Szakirodalmi adatok (Qiu és mtsai, 2014, Van Trappen és mtsai, 2005, Zhang és mtsai, 2007a, Shen és mtsai, 2015, Qiu és mtsai, 2016) alapján elmondható, hogy az olvadéktó vizsgálata során azonosított legtöbb baktériumfaj hőmérsékleti optimuma 20 °C alatti, így ezek a szervezetek a pszichrofil baktériumok közé tartoznak (*Flavobacterium psychrolimnae*, *Cryobacterium psychrotolerans*, *Massilia eurypsychrophila*, *Roseomonas arctica*). Típustörzsüket magashegyi vagy poláris régiók periglaciális területeiről izolálták (pl. Svalbard vagy Antarktisz) (Van Trappen és mtsai, 2005, Zhang és mtsai, 2007a, Shen és mtsai, 2015, Qiu és mtsai, 2016). Az alacsony hőmérsékleti optimum alapján a kimutatott baktériumok képesek lehetnek aktív anyagcserét folytatni a magashegyi olvadéktó környezetében.

A tavi üledékmintából kimutatott *Flavobacterium psychrolimnae* típustörzsét (mely 5-25 °C között, optimálisan 20 °C-on nő) édesvízi biofilmből izolálták az antarktiszi Száraz-völgyek egyik tavából (Van Trappen és mtsai, 2005). Az általunk azonosított baktériumfajok közül többnek a típustörzsét is gleccserek környezetéből vonták tenyésztésbe: a fakultatív pszichrofil *Massilia eurypsychrophila* típustörzse egy kínai gleccser környezetéből származik (Shen és mtsai, 2015), míg a *Cryobacterium psychrotolerans* típustörzsét a Tianshan hegységben található hegyi sivatag „No. 1” nevű gleccserének környezetéből izolálták (Zhang és mtsai, 2007a). A *Pedobacter huanghensis* és a *Roseomonas arctica* fajokat egyaránt poláris régióban található gleccservölgyek környezetéből vonták tenyésztésbe, mindkettőt a norvégiai Svalbard szigetén (Qiu és mtsai, 2014, Qiu és mtsai, 2016).

Meglepő módon az olvadéktó üledékéből tenyésztéses módszerekkel feltárt taxon-diverzitás nagyobb volt, mint a kanadai Arktiszon, permafroszt aktív réteg vizsgálata során tapasztalt, ahonnan kizárólag egy nemzetség (*Arthrobacter*) tagjait azonosították (Wilhelm és mtsai, 2011). Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékéből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek sok reprezentánsa tartozott ebbe a nemzetségbe. Számos mikrobiológiai kutatás eredménye alapján a nemzetség gyakori permafrosztos üledékekben. Jelenlétéről (a kanadai arktiszon kívül) beszámoltak a Tien-San-hegységben (Bai és mtsai, 2006) és Szibériában is (Bakermans és mtsai, 2003, Vishnivetskaya, és mtsai, 2006).

5.2.3 Az olvadéktóból tenyésztésbe vont baktériumtörzsek pH toleranciája

Az olvadéktóból tenyésztésbe vont baktériumtörzsek közül 25 törzsnek határoztuk meg a pH toleranciáját, a kapott eredményeket az 17. ábra összegzi.



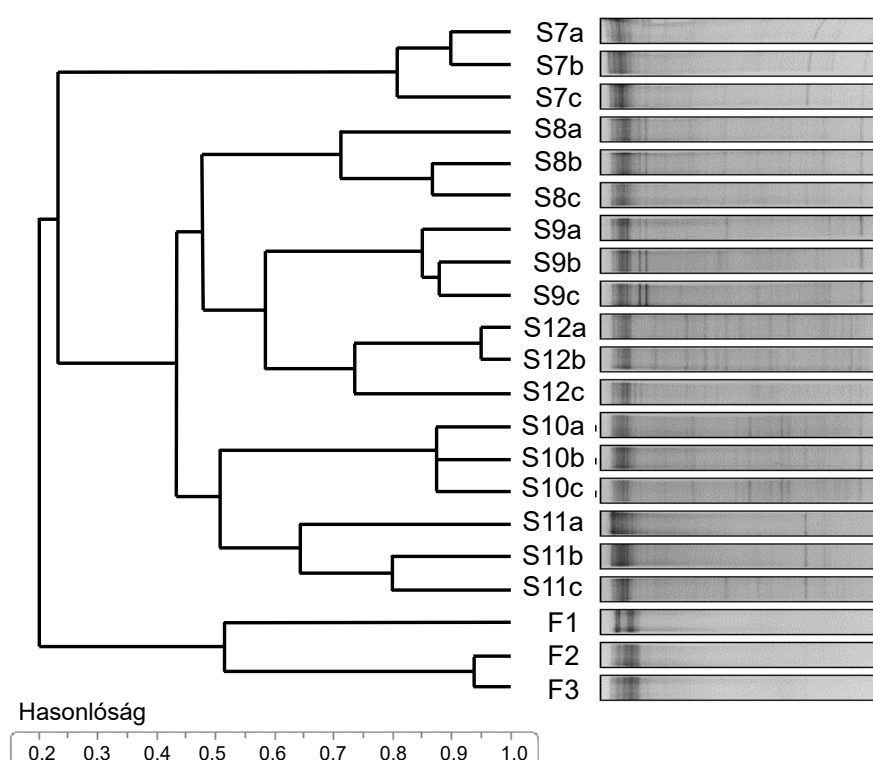
17. ábra Az Ojos del Salado olvadéktavából származó baktériumtörzsek pH toleranciája

A Mann-Whitney U teszt alapján a pH 5 vagy annál savasabb táplevesek optikai denzitása között nem volt szignifikáns különbség az inkubációt követően ($p > 0,05$), ami jelzi, hogy pH 6 alatt nem mutattak számottevő növekedést a baktériumtörzsek. Mindössze két baktériumtörzs, a PS7-8 (*A. pityocampae*) és a RS7-11 (*A. ginsengisoli*) mutatott gyenge növekedést alacsonyabb pH-n (pH 5), növekedési optimumuk azonban ezeknek is közel semleges (pH 6) volt. A pH 6 és pH 7 tápleveseknél mért OD értékek átlaga szignifikánsan különbözött az összes alacsonyabb pH-n mért értékektől ($p < 0,05$), de egymástól nem, így elmondható, hogy a vizsgált baktériumtörzsek ugyanolyan mértékű növekedést mutattak a neutrális közeli táplevesekben.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az olvadéktóból tenyésztésbe vont baktériumtörzsek a neutrofil szervezetek közé tartoztak, hiszen közel neutrális kémhatáson mutatták a legnagyobb mértékű növekedést.

5.2.4 Az olvadéktóból származó minták DGGE vizsgálatának eredményei

A víz- és üledékminták 16S rRNS gén DGGE molekuláris ujjlenyomata alapján készített UPGMA dendrogramon (18. ábra) a különböző mélységekből (felső 5 cm, vagy 10 cm) származó permafroszt- és tavi üledék (S7-S8-S9-S10-S11-S12) valamint a víz minták (F1-F2-F3) jól elkülönültek egymástól. Az azonos mintavételi helyről származó (azonos számjelzésű) párhuzamos minták egymáshoz mutatták a legnagyobb hasonlóságot.



18. ábra Az Ojos del Salado olvadéktavának üledék- és vízmintáira jellemző baktériumközösségek DGGE molekuláris ujjlenyomatainak UPGMA hasonlósági dendrogramja

Az UPGMA dendrogramon az S7 tavi üledékminták elkülönültek a többi üledéktől, és teljesen külön csoportosult a három vízminta is. A DGGE molekuláris ujjlenyomat alapján létrehozott dendrogram azt mutatja, hogy az üledék mélysége (felső 5 cm vagy 10 cm) nem befolyásolta a baktériumközösség szerkezetét, ami arra utal, hogy feltehetően ugyanazok a domináns baktériumtaxonok vannak jelen a permafroszt aktív rétegének teljes mélységében.

5.2.5 Az olvadéktó baktériumközösségeinek összetétele újgenerációs DNS szekvenálással

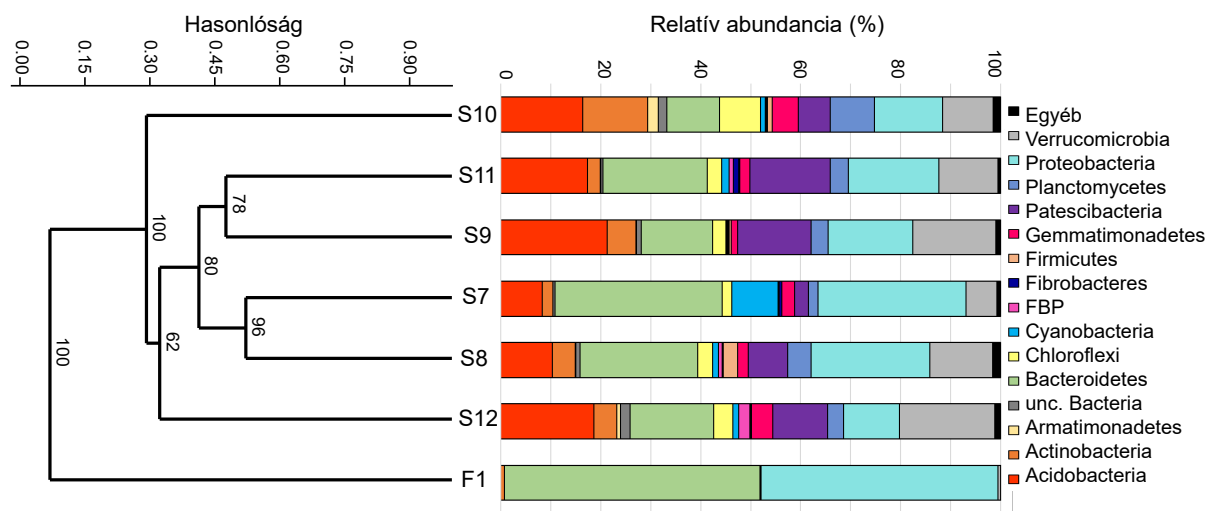
Az Ojos del Salado permafroszt degradáció révén keletkezett olvadéktavának környezetéből származó minták kompozit közösségi DNS-éből Illumina MiSeq újgenerációs DNS szekvenálással a 16S rRNS gén vizsgálatával tártuk fel a baktériumközösségek diverzitását. Összesen 447 253 (mintánként 24 372-94 052) szekvenciát elemeztünk. A szekvenálás eredményeit, illetve a kapott adathalmaz alapján megállapított diverzitás indexeket a 9. táblázat összegzi.

9. táblázat Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékéből és vizéből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek legfontosabb paraméterei és diverzitás indexei

Minta	Törzsek száma	Nemzetségek száma	OTU-k száma	Szekvenciák száma	Good's coverage	Shannon index	Inverz Simpson diverzitás
F1	15	123	218	94052	1	2,6	6,6
S7	24	332	729	90765	1	4,6	35,0
S8	25	322	681	50915	1	5,3	97,1
S9	24	240	505	24372	1	4,7	46,9
S10	28	335	839	81372	1	5,5	124,0
S11	23	295	658	57257	1	5,0	68,7
S12	25	244	623	48520	1	4,7	38,8

Az diverzitás indexek alapján az újgenerációs szekvenálással nyert adatok jól leírják a vizsgált baktériumközösségeket. A megfigyelt OTU-k száma megmutatta, hogy a filotípusos diverzitás a vízmintában (F1) alacsonyabb volt, mint a tavi vagy permafroszt üledékekben. A baktériumközösségek komplexitását tekintve a Shannon index és az inverz Simpson diverzitás egyaránt arra utal, hogy az üledékekben található baktériumközösségek komplexebbek, ami különösen jellemző volt a mélyebb rétegekre (S8 és S10). Ez a jelenség a mélységgel párhuzamosan növekvő vízakivitással magyarázható: a fokozott párolgás az üledékek felszíni részét jobban érinti, néhány centiméterrel mélyebben azonban nedvesebb tud maradni az aktív réteg, ami kedvezően hathat a taxon-diverzitásra. Hasonlóképpen az intenzív napsugárzás is stresszfaktor lehet a felszínen található baktériumközösségek számára.

A tavi- és permafroszt mintákra jellemző domináns filogenetikai törzsek aránya, valamint a detektált OTU-k előfordulása alapján létrehozott Bray-Curtis hasonlósági indexek felhasználásával elkészített UPGMA dendrogram a 19. ábrán látható.



19. ábra Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetéből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek összehasonlítása Bray-Curtis hasonlóságon alapuló UPGMA dendrogramon és a szekvenciák megoszlása a filogenetikai törzsek között

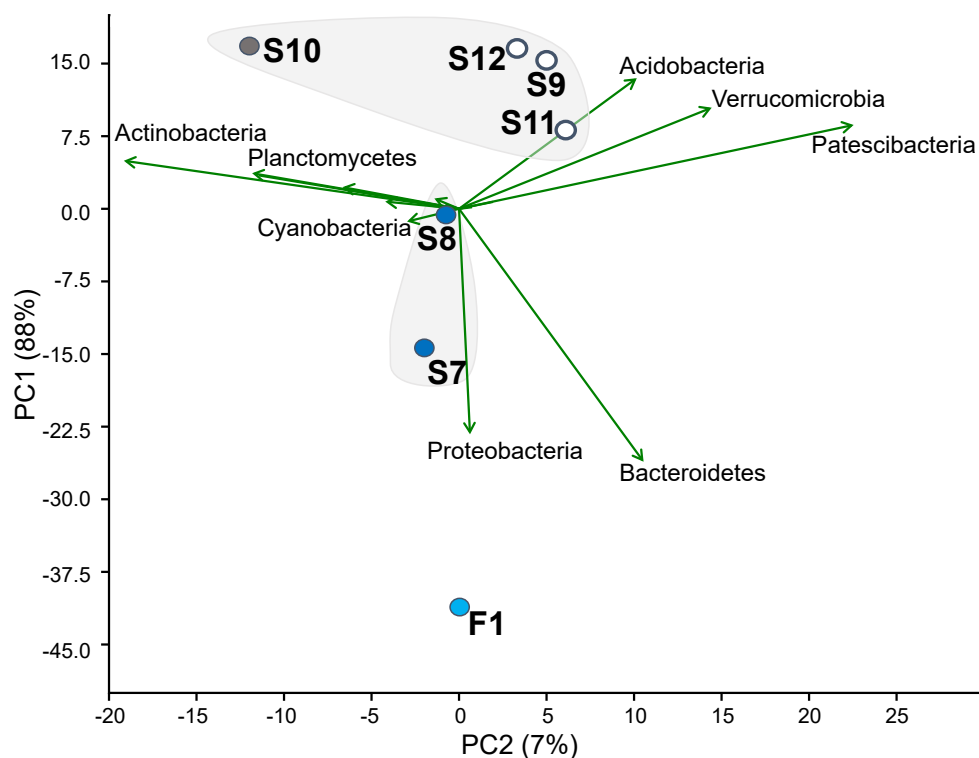
A vizsgált vízmintában a Bacteroidetes (51,1%) és Proteobacteria (47,3%) képviselői voltak a dominánsak, és csak kevés szekvencia mutatott az Actinobacteria (0,8%) és Verrucomicrobia (0,5%) és egyéb törzsekre. A tavi üledékben (S7 és S8) a Proteobacteria (29,6 és 23,7%) és Bacteroidetes (33,4 és 23,5%) mellett az Acidobacteria (8,4 és 10,4%), a Verrucomicrobia (6,1 és 12,6%) a Cyanobacteria (9,3 és 1,2%) és a Patescibacteria (2,7 és 7,8%) voltak jelen legnagyobb arányban. A permafroszt üledék (S9, S11 és S12) felső 5 cm-ében a Proteobacteria ($\leq 18,1\%$) és Bacteroidetes ($\leq 20,8\%$) relatív abundanciája kisebb volt, mint a tavi környezetekben, és megnőtt az Acidobacteria (17,3-21,3%), a Patescibacteria (10,9-16,1%) és a Verrucomicrobia (11,8-19,1%) törzsek aránya a közösségben. A permafroszt üledékben 10 cm mélyen (S10) a Proteobacteria aránya mindössze 13,6%, a Bacteroidetes aránya 10,5%-ra csökkent, és olyan törzsek relatív abundanciája volt nagyobb a többi környezethez képest, mint az Actinobacteria (13,0%), a Chloroflexi (8,3%), az Armatimonadetes (2,2%), a Gemmatimonadetes (5,2%) és a Planctomycetes (8,8%), de nagy arányban volt jelen a Verrucomicrobia (10,1%), az Acidobacteria (16,4%) és a Patescibacteria (6,4%) is. A filogenetikai törzsek megoszlásából, valamint a diverzitás indexekből is látszik, hogy a permafroszt üledék mélyebb rétegeiben található baktériumközösségek diverzitása nagyobb, mint a felszíni üledékben, a tavi üledékekben vagy a tóvízben.

A Bray-Curtis hasonlósági dendrogramon a DGGE molekuláris ujjlenyomatok alapján készült dendrogramhoz hasonlóan a víz (F1) és üledékminták (S7-S12) külön

csoportot alkottak. Itt a tavi üledékekre (S7, S8) jellemző baktériumközösségek mutatták a legnagyobb hasonlóságot egymáshoz, és közös csoportot alkottak a permafroszt felső rétegéből származó üledékminták (S9, S11) baktériumközösségeivel. A permafroszt üledék mélyebb rétegeiből származó minta (S10) elkülönült a többi üledéktől. Feltételezhető, hogy a felszíni üledékmintákra jellemző baktériumközösségek hasonlóságát okozó tényezők között az erős besugárzás, a sorozatos olvadási-fagyási ciklusok és az üledék sorozatos száradási ciklusai által jelentett szelekciós tényezők alakítják. Az üledék alsóbb rétegeiben ezen tényezők mérséklődnek (pl. kiszáradás, olvadás) vagy megszűnnek (pl. besugárzás). Bár az alacsony átlaghőmérséklet miatt szélsőséges környezetnek tekintjük, a permafrosztnak fontos tulajdonsága, hogy állandó környezet is. Ez lehetőséget ad az itt élő mikroorganizmusoknak a környezet szélsőségeihez való adaptációra. A permafroszt aktív rétegére emiatt jellegzetesen más mikrobiológiai diverzitás jellemző, mint a permafroszt tábla folyamatosan fagyott rétegeire (Jansson és Taş, 2014). A kapott eredményeink arra utalhatnak, hogy a környezet állandósága az aktív rétegben a mélységgel nő.

Az újgenerációs szekvenálás során feltárt baktériumközösségek főkomponens analízissel történő elemzése szintén rámutatott a permafroszt különböző rétegei között fennálló varianciára (20. ábra). A víz, a tavi üledék és a permafroszt üledék minták a variancia 88%-áért felelős első főkomponens mentén váltak el. A biploton látható, hogy szinte kizárólag a Proteobacteria törzs járult hozzá a varianciához. Ugyan a második főkomponens a minták közötti változatosság mindössze 7%-át adta, a 10 cm mélyről származó (S10) és felszíni (S9, S11, S12) permafroszt üledékminták két külön csoportot képeztek, míg a víz és a tavi üledékek a kettő között helyezkedtek el. A második főkomponensen megfigyelhető varianciát a kevésbé abundáns törzsek okozták, míg az Acidobacteria, a Verrucomicrobia és a Patescibacteria a felszíni üledékekre, addig az Actinobacteria és a Planctomycetes inkább a 10 cm mélyről származó minták baktériumközösségeire volt jellemző.

Mindössze 12 olyan nemzetséget mutattunk ki, melyek legalább 1%-os relatív abundanciával voltak jelen a vízmintában. Ezek közül a *Massilia* (25,5%) és a *Flavobacterium* (36,0%) nemzetségek voltak a leggyakoribbak. A további nemzetségek között szerepelt az *Algoriphagus* (1,3%), a *Hymenobacter* (2,2%), a *Spirosoma* (1,6%), a *Brevundimonas* (4,6%), a *Porphyrobacter* (2,8%), a *Sphingorhabdus* (6,7%), a *Hydrogenophaga* (1,1%) és két ezidáig tenyésztésbe nem vont nemzetség, melyek a Bacteroidetes, valamint a Proteobacteria törzsbe tartoznak, képviselőik a közösségek 4,4% és 2,9%-át tették ki.

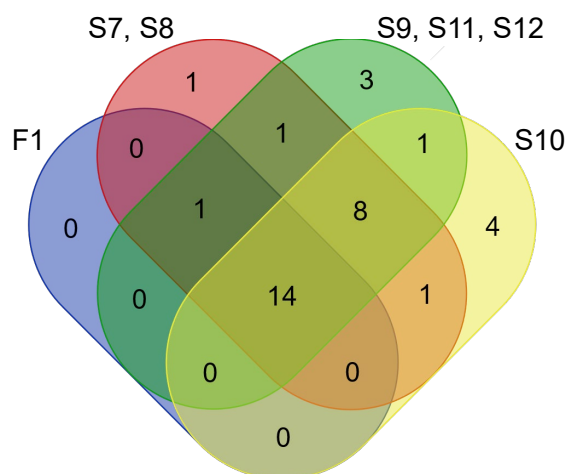


20. ábra Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetéből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek összehasonlítása főkomponens analízissel

Az üledékminták baktériumközösségeit egyenként 21-29 nemzetség alkotta. Összesen 6 olyan nemzetség volt (*Blastocatella* és *Sphingomonas*, valamint négy unclassified nemzetség), amelynek legalább 1% volt a relatív abundanciája mind a hat üledékmintában. Ezek mellett a leggyakoribb, legalább 4% relatív abundanciával rendelkező nemzetségek a *Fluviicola* (10,0%), az *Algoriphagus* (5,0%) és a *Luteolibacter* (5,0%) voltak.

Az egyes mintatípusokban (vízminta, tavi üledék, felszíni permafroszt üledék és 10 cm mély permafroszt üledék) kimutatott filogenetikai törzsek közti átfedéseket az

21. ábra vizualizálja. Összesen 14 olyan törzs volt, mely mindegyik mintában előfordult, 19 törzs kizárólag az üledékekből volt kimutatható. A vizsgálatok során nem azonosítottunk olyan törzset, ami csak a vízben volt jelen, és a tavi üledékből hiányzott. A kizárólag a permafroszt üledékekre jellemző törzsek közül 3 csak a felszíni, 4 csak a mélyebb rétegből származó mintában volt jelen.



21. ábra Az Ojos del Salado 5900 m tszf fekvő olvadéktavának környezetéből újgenerációs szekvenálással detektált filogenetikai törzsek megoszlása a vizsgált mintatípusok között

(F1: víz, S7, S8: tavi üledék, S9, S11, S12: felszíni permafroszt üledék, S10: permafroszt üledék 10 cm mélyen)

A vizsgált szekvenciák filogenetikai elemzésének legmeglepőbb eredménye az ezidáig ismeretlen baktériumfajokhoz és kandidátus taxonokhoz sorolható szekvenciák nagy aránya volt. A baktériumok esetében a faji elkülönülés határának tekintett 16S rRNS gén szekvencia 97%-os hasonlóságát alkalmazva (Stackebrandt és Goebel, 1994) elmondható, hogy az ezidáig tenyésztésbe nem vont, be nem sorolható vagy kandidátus nemzetségbe tartozó baktériumfajokra utaló szekvenciák aránya a vizsgált üledékmintákban 46% és 79% között mozgott, és 12% volt a vízmintában. Számos, NGS-el kimutatott domináns nemzetség ez idáig tenyésztésbe nem vont (uncultured vagy unclassified) taxonba tartozott (melyek a Patescibacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Proteobacteria vagy Verrucomicrobia törzsek tagjai voltak). Ez az eredmény összhangban van a korábbi vizsgálatokkal, melyek során 16S rRNS alapú klóntárakkal történő elemzés alapján a molekuláris klónok többsége is tenyésztésbe nem vont taxonnal mutatott egyezést

(Aszalós és mtsai, 2016) és megerősíti azt az elképzelést, miszerint az Ojos del Salado elszigetelt területén a különféle periglaciális környezetek ez idáig ismeretlen mikroorganizmusoknak adnak otthont. Olyan szekvenciákat is kimutattunk, melyek a közelmúltban leírt Abditibacteriota törzs (korábban FBP kandidátus törzs) képviselői közé tartoztak (jelenleg az egyetlen leírt faj az obligát oligotróf *Abditibacterium utsteinense*, Tahon és mtsai, 2018). A vizsgált üledékmintákban előfordultak az *Udaeobacter* nemzetség (Verrucomicrobia) tagjai is, melyek számos különféle típusú talajban megtalálhatóak (Brewer és mtsai, 2017). Fontos kiemelni, hogy a Száraz-Andokban végzett más vizsgálatok során is hasonlóan magas arányban detektáltak tenyésztésbe nem vont vagy ismeretlen baktériumokra utaló szekvenciákat (Solon és mtsai, 2018, Costello és mtsai, 2009, Lynch és mtsai, 2012).

5.2.6 Az olvadéktó baktériumközösségeinek összevetése hasonló élőhelyek diverzitásával

Az olvadéktó és környezetének üledékéből NGS-el feltárt baktériumközösségekben a filogenetikai törzsek diverzitása hasonló volt ahhoz, amit korábban molekuláris klónozásos vizsgálattal mutattunk ki (Aszalós és mtsai, 2016). Az Illumina szekvenálás jobb felbontásának köszönhetően számos kevésbé gyakori (minor) törzs jelenlétét is detektáltuk (pl. Patescibacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Abditibacteriota/FBP, Firmicutes, Armatimonadetes, Fibrobacteres).

A feltárt baktériumközösségek egyes képviselői (pl. Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria) különféle periglaciális környezetek gyakori közösségalkotó taxonjai. Az Ojos del Salado olvadéktavában, valamint hasonló magashegyi periglaciális élőhelyeken található baktériumközösségek közötti legnagyobb különbségek a minor taxonok (pl. Armatimonadetes, FBP, Firmicutes, Cyanobacteria,) esetében voltak megfigyelhetők. Bár a Száraz-Andokban nem találhatók gleccserek, magashegyi vizes élőhelyek a Föld más tájain gyakran kapcsolatban állnak gleccserekkel, így a vizsgált olvadéktó környezetéből feltárt baktériumközösségek számos alkotóját mutatták ki gleccserekkel kapcsolatban álló élőhelyeken.

Összehasonlításképp, a kanadai Arktisz permafrosztjának mikrobiális közösségei kis mértékben különböztek az Ojos del Salado olvadéktavában detektált közösségektől, hiszen az Acidobacteria törzs képviselőit csak a mérsékelt savas Nunavut permafroszt lápon detektálták (Wilhelm és mtsai, 2011), de nem mutatták ki a Nunavut permafroszt

üledékben (Steven és mtsai, 2007) vagy a kanadai szubarktiszi permafroszt olvadéktavainak üledékéből (Comte és mtsai, 2016).

A Száraz-Andok 5000 méternél magasabban fekvő területein végzett mikrobiológiai kutatásokhoz hasonlóan a mi eredményeink is leegyszerűsödött baktériumközösségek jelenlétét jelzik, ami jól tükrözi a vizsgált területekre jellemző alacsony tápanyagkoncentrációt (Costello és mtsai, 2009, Lynch és mtsai, 2012, Solon és mtsai, 2018). Bár a Száraz-Andok magashegyi permafroszt üledékeinek mikrobiótájáról eddig csak néhány nagy felbontású, újgenerációs DNS szekvenálással végzett vizsgálat készült (pl. a Socompa és Llullaillaco vulkánok permafrosztos környezeteiben), a legtöbb eredmény szerint a hideg és száraz üledékekben nem voltak megtalálhatók a Cyanobacteria törzs képviselői (Costello és mtsai, 2009, Lynch és mtsai, 2012), ám gyakorta jelen voltak melegebb élőhelyeken, például fumarolákkal kapcsolatban álló üledékekben (Solon és mtsai, 2018). Ennek ellenére az Ojos del Salado olvadéktavából származó összes üledékmintában (legmagasabb arányban a tavi üledékből származó S7 azonosítójú mintában) detektáltunk cianobaktériumokat, igaz, általában alacsony relatív abundanciával. Kizárólag a tavi felszíni üledékmintában (S7) volt jelen a törzs kiugróan magas arányban (9%).

A detektált nemzetségek között sok olyan fordult elő, melyeket korábban más poláris vagy periglaciális környezetekben is megtaláltak (pl. *Massilia*, Shen és mtsai, 2015). Számos olyan nemzetség (*Hymenobacter*, *Segetibacter*, *Sphingomonas*, *Blastocatella*, valamint a Chitinophagaceae vagy a Gemmatimonadaceae család képviselői), amit a (szintén a Száraz-Andokban található) Socompa és Llullaillaco vulkánokon mutatottak ki Solon és mtsai (2018) előfordult az Ojos del Salado permafroszt olvadéktavainak környezetében is.

A szekvenálás során a Bacteroidetes törzs mindkét tenyésztésbe vont nemzetségét kimutattuk, más szekvenciák pedig a *Segetibacter*, az *Algoriphagus*, a *Sporocytophaga*, a *Hymenobacter*, a *Fluviicola* és a *Persicitalea* nemzetségek jelenlétére utaltak. Az *Algoriphagus* nemzetségbe egy faj tartozik, a pszichrofil *A. ratkowsky*, melyet tengeri jégből és sós tavak mikrobiális bevonataiból izoláltak, és -2 és 35 °C között képes növekedésre (Bowman és mtsai, 2003). A szigorúan aerob *Hymenobacter* (Hirsch és mtsai, 1998) nemzetség tagjait is gyakran izolálták száraz és hideg környezetekből, például az antarktiszi Száraz-Völgyekből (Hirsch és mtsai, 1998).

A Proteobacteria törzs képviselői közül a legnagyobb arányban a Gammaproteobacteria és az Alphaproteobacteria osztály képviselői fordultak elő.

Kizárólag az üledékmintákra volt jellemző a Deltaproteobacteria osztály jelenléte. A Gammaproteobacteria osztályon belül a Betaproteobacteriales rend (korábban Betaproteobacteria osztály) tagjai nagy arányban voltak jelen, a leggyakoribb nemzetségek a *Hydrogenophaga*, *Methylophilus*, *Pseudohongiella*, *Pseudomonas*, *Thermomonas*, és *Lysobacter* voltak. A *Methylophilus* nemzetség tagjai megtalálhatóak iszapban, folyókban és tavakban, és gyakori közösségalkotók oligotróf élőhelyeken, többek között kimutatták a jelenlétüket alaszakai arktiszi tavak mikrobiológiai közösségeiben (Bahr és mtsai, 1996).

Az Alphaproteobacteria képviselői közül a vízben a *Sphingorhabdus* nemzetség tagjaira utaló szekvenciák voltak legnagyobb arányban. Ezeken kívül az üledékekben más alfaproteobaktériumokat is detektáltunk. A tenyésztés során is kimutatott *Brevundimonas* mellett az elsőként antarktiszi permafrosztból izolált *Polymorphobacter* nemzetség képviselői is előfordultak a vizsgált üledékekben. A *Polymorphobacter* nemzetségbe $-4-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ között növekedést mutató (optimum: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) pszichrotoleráns aerob, heterotróf baktériumok tartoznak, melyeket különösen nagy morfológiai diverzitás jellemez (Fukuda és mtsai, 2014). Kimutattuk az édesvizekben gyakran előforduló aerob, bakterioklorofillt termelő narancs- vagy vörösszínű telepeket képző nemzetség, a *Porphyrobacter* képviselőit is (Fuerst és mtsai, 1993).

A Deltaproteobacteria osztály a vízmintában nem fordult elő, az üledékmintákban a törzs tenyésztésbe ezidáig nem vont, ismeretlen nemzetségei mellett főként a *Peredibacter* és a *Haliangium* nemzetséget azonosítottuk. A *Peredibacter* nemzetség tagjai változatos élőhelyeken (talaj, vízi élőhelyek, biofilmek) előforduló, motilis predátor baktériumok, melyeknek más Gram-negatív baktériumok lehetnek a prédái. A predátor baktériumok jelenlegi ismereteink szerint két osztály, a Bdellovibrionaceae és a Bacteriovoracaceae képviselői, a *Peredibacter* ez utóbbinak a tagja. Tenyésztéses vizsgálatuk igen nehéz, hiszen kizárólag a prédával együtt vonhatók tenyésztésbe (Davidov és mtsai, 2006). A *Haliangium* nemzetségbe eredetileg sós környezetekben előforduló baktériumok tartoznak, melyek növekedésükhöz 2-3% NaCl koncentrációt igényelnek (Fudou és mtsai, 2002).

A diverz Acidobacteria törzsbe sok ezidáig tenyésztésbe nem vont baktérium tartozik, melyeket pusztán 16S rRNS génjeik alapján sorolnak 26 szubdivízióba (Huber és mtsai, 2017). Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetében a két csoport, a Blastocatellales és a Pyrinomonadales rend tagjai fordultak elő legnagyobb arányban.

A Patescibacteria superphylum képviselőit más magashegyi permafroszt területeken is domináns közösségalkotó taxonként azonosították (Altschuler és mtsai,

2017). Több kutatás is beszámolt arról, hogy a taxonba tartozó, kizárólag még tenyésztésbe nem vont baktériumok által alkotott kandidátus filogenetikai törzsek képviselői más magashegyi talajokhoz viszonyítva nagyobb arányban vannak jelen permafroszt területeken (Altschuler és mtsai, 2017). A csoport nagy létszáma az általunk vizsgált mintákban megerősíti ezeket az eredményeket, és rámutat a magashegyi permafroszt környezetek tenyésztéses vizsgálatának jelentőségére.

A *Verrucomicrobia* törzs képviselői minden üledékmintában gyakori alkotói voltak a baktériumközösségeknek. Az *Opitutus* nemzetség tagjait nagy relatív abundancia jellemezte, első típustörzsét egy rizsföld agyagos talajából vonták tenyésztésbe (Chin és mtsai, 2001). Az üledékekben szintén gyakori *Luteolibacter* nemzetséget elsőként mezofil baktériumokként írták le (Yoon és mtsai, 2008), később azonban a norvégiai Svalbard szigeten található tundra talajból is tenyésztésbe vonták egy fajtát (*Luteolibacter luojiensis*, Jiang és mtsai, 2012). Ez a baktérium jóval alacsonyabb hőmérsékleti optimummal (4-28 °C) rendelkezik, mint legközelebbi rokonai (20-37 °C).

Az *Armatimonadetes* törzsből a *Fimbriimonadaceae* család egyik ez idáig tenyésztésbe nem vont faja volt gyakori a vizsgált üledékekben. A család első tenyésztésbe vont képviselőjét oligotróf (ötszörösen hígított R2A) táptalajon vonták tenyésztésbe egy ginzengföld talajából. A szigorúan aerob baktérium (*Fimbriimonas ginsengisoli*) fehér pigmentáltságú telepeket képez, 15-30 °C között képes növekedni NaCl jelenléte nélkül (Im és mtsai, 2012).

Az *Actinobacteria* törzs permafroszt üledékekben gyakran domináns, melyet többféle molekuláris módszerrel is kimutattak (Gilichinsky és mtsai, 2008). Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetében öt nemzetség, az *Antricoccus*, a *Quadrisphaera*, a *Nocardioides*, a *Marmoricola* és a *Gaiella* képviselői fordultak elő legnagyobb arányban. Az *Antricoccus* nemzetség típusfajtát barlangi környezetből írták le (Lee, 2015), a *Marmoricola* nemzetség típusfajtát egy márványszoborból vonták tenyésztésbe, a nemzetség képviselői előfordulnak különféle típusú talajokban és üledékekben, mezőgazdasági talajokon kívül vulkáni hamuból és tengeri üledékből is izolálták őket (Lee és Lee, 2010). A *Nocardioides* képviselői gyakoriak permafroszt üledékek baktériumközösségeiben, szibériai és antarktiszi permafrosztból egyaránt kimutatták őket (Gilichinsky és mtsai, 2008).

5.2.7 *Az olvadéktó baktériumközösségeinek potenciális anyagcsere diverzitása*

Az összes detektált filogenetikai törzs képviselői között jellemzően az oligotróf szervezetek jelenléte volt megfigyelhető, ami megerősíti a tenyésztés eredményeit, miszerint a vizsgált baktériumközösségek tagjai jól alkalmazkodtak a környezet alacsony szerves anyag koncentrációjához. Számos olyan nemzetség képviselőit mutattuk ki a vizsgált üledékmintákból szekvenálással, melyeket eredetileg oligotróf környezetekből írtak le (pl. *Sphingorhabdus*, *Brevundimonas*, vagy az *Abditibacterium*). A környezetre jellemző más szélsőségek, például az erős UV sugárzás, alacsony hőmérséklet és rendszeres kiszáradás is hatással volt a vizsgált baktériumközösségek szerkezetére. Az *Acidobacteria* törzs két rendjét (*Pyrinomonadales*, *Blastocatellales*) mutattuk ki, az ide tartozó baktériumok jól adaptálódtak a tápanyaglimitált környezetekhez és a kiszáradáshoz, valamint széles toleranciát mutatnak a környezet pH-jával és hőmérsékletével szemben (Huber és mtsai, 2017).

Az extrém környezetben kialakult közösségekre változatos anyagcsere diverzitás jellemző. Az újgenerációs szekvenálás eredményei megmutatták, hogy aerob és anaerob baktériumok is előfordulnak a vizsgált üledékekben, köztük pedig fotoautotróf, kemolitoautotróf, fotoheterotróf és kemoheterotróf anyagcserét folytató szervezetek egyaránt megtalálhatók voltak.

A fotoautotróf cianobaktériumok főként a tavi üledékre voltak jellemzőek, közülük a *Nodosilinea nodulosa* PCC-7104 volt a leggyakoribb (9%). Ezt a baktériumtörzset eredetileg tengeri kőzetszínről izolálták az USA-ban a New York állambeli Montauk Port-nál, és nitrogén-fixációra való képességét is kimutatták (Perkerson III és mtsai, 2011). A cianobaktériumok kisebb arányban voltak jelen a permafroszt üledékekben, ahol elsősorban a *Nostocales* rend tagjait mutattuk ki.

A kemolitoautotróf nemzetségek közé tartozott például a vízben és tavi üledékekben gyakori *Hydrogenophaga*, ami hidrogén oxidációja mellett képes a széndioxidot, mint kizárólagos szénforrást hasznosítani (Kämpfer és mtsai, 2005). Az összes üledékben gyakori volt a *Nitrospira* nemzetség, melynek egyes tagjai az ammónia teljes, nitráttá történő oxidációjára képesek (Daims és mtsai, 2015), ami okozhatta a víz alacsony ammónia és magas nitrát koncentrációját. Sok kemolitoautotróf faj (pl. *Thiobacillus*, *Acidiferrobacter*, *Acidithiobacillus*, *Sulfurifustis*, *Sulfurirhabdus*) nagyon alacsony relatív abundanciával ugyan, de kimutatható volt több vizsgált üledékből is.

Az anaerob anyagcserére képes heterotróf szervezetek közül az obligát anaerob *Opitut* nemzetség minden üledékmintában jelen volt. Az egyetlen ide tartozó ismert faj, az *O. terrae* mono-, di- és poliszacharidokat képes acetáttá vagy propionáttá fermentálni, valamint nitrátot nitritté redukálni (Chin és mtsai, 2001), aktivitásával tehát hozzájárulhat a víz magasabb nitrit tartalmához. A Chloroflexi számos rendjét, köztük az anoxikus fototrófokat magába foglaló Chloroflexales képviselőit is kimutattuk.

Az aerob heterotróf baktériumfajok nagyon sok képviselőjét kimutattuk, legnagyobb relatív abundanciával a *Blastocatella*, a *Segetibacter*, az *Algoriphagus*, a *Fluviicola*, a *Flavobacterium*, a *Brevundimonas*, a *Sphingomonas*, a *Sphingorhabdus*, a *Massilia*, a *Chthoniobacter* és a *Luteolibacter* fordult elő. A heterotrófok közé tartozik a fakultatív metanol-hasznosító (és néhány egyéb, komplexebb szerves molekula hasznosítására is képes) Gram-negatív *Methylophilus* nemzetség is (Jenkins és mtsai, 1987). A vízmintában azonosított, tipikusan édesvízi, oligotróf tavakban gyakorta előforduló szervezeteket magába foglaló Sphingomonadaceae család, valamint az üledékekből kimutatott *Novosphingobium* és *Phenylobacterium* nemzetség képviselői egyaránt képesek xenobiotikumok és policiklusos aromás vegyületek lebontására (Jogler és mtsai, 2013, Lyu és mtsai, 2014, Singleton és mtsai, 2016).

A heterotróf szervezetek nagy diverzitása és relatív abundanciája alapján kijelenthető, hogy a szélsőséges környezet ellenére legalább két trofikus szint megtalálható a vizsgált vízben és üledékekben. A szélsőséges környezet, változatos anyagcsere diverzitás és a korábban tenyésztésbe nem vont baktériumfajok nagy aránya miatt az Ojos del Salado olvadéktava alkalmas lehet a biotechnológia számára érdekes fajok felkutatására.

5.3 Baktériumközösségek diverzitása az Ojos del Salado kráterének vizes környezeteiben

5.3.1 A vizsgált környezetek fizikai-kémiai paraméterei

Az Ojos del Salado krátertavának és a kráterben található fumarolákból eredő patak vizének abiotikus jellemzői közül helyszíni mérés során meghatároztuk a pH-t és hőmérsékletet. A fumarolákból feltörő víz kémhatása pH 2,1 volt, hőmérséklete a fumaroláktól távolodva csökkent, az FC-1 mintavételi ponton (40 m-re a fumarolától) 40,8 °C volt és az FC-2 mintavételi pontig (80 m-re a fumarolától) 34,7 °C-ra csökkent. A krátertó vizének hőmérséklete 3,8 °C, pH-ja 4,9 volt. Látható, hogy mindhárom

mintavételi helyet savas kémhatás jellemezte, a hőmérséklet viszonylag széles skálán változott. Az FC-1 és FC-2 mintákra jellemző, a fumarolák működésének köszönhetően magas hőmérséklet ilyen nagy tengerszint feletti magasságban ritkán fordul elő.

10. táblázat Az Ojos del Salado vulkánon 6480 m tszf magasságban található krátertó (LW) és fumarolás patak (FC) vizének kémiai paraméterei

	FC-W	LW
Hőmérséklet (°C)	40,8	3,8
pH	2,1	4,9
Fajlagos vez. kép. (µS/cm)*	1360	n.a
NH ₄ ⁺ (mg/l)*	1,30	n.a
NO ₂ ⁻ (mg/l)*	<0,01	n.a
NO ₃ ⁻ (mg/l)*	57,2	n.a
PO ₄ ³⁻ (mg/l)*	0,06	n.a
Fe (mg/l)*	17,8	n.a
SO ₄ ²⁻ (mg/l)*	430	n.a
IC (mg/l)	1,67	1,71
TOC (mg/l)	5,33	3,40
TN (mg/l)	3,38	0,43

*A kapott vízminta kis mennyisége miatt a krátertóból több paraméter meghatározása nem volt lehetséges. n.a: nincs adat

A krátertóból származó vízmintából laboratóriumi mérésekkel a tóvíz további kémiai paramétereit (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, Fe, SO₄²⁻, IC, TOC, TN) is megállapítottuk (10. táblázat).

5.3.2 A kráterkörnyezet tenyésztési vizsgálatának eredményei

A becsült átlagos csíraszám a tápanyagszegény R2A táptalajon egy nagyságrenddel magasabb volt ($1,2 \times 10^5$), mint a PYG lemezekén ($3,0 \times 10^4$). Feltételezhető, hogy a krátertó üledékének tápanyagszegény környezetében főként oligokarbofil baktériumok alkotnak közösséget, melyek jól adaptálódtak az alacsony tápanyagkoncentrációhoz.

A becsült átlagos telepképző egységek grammra vonatkoztatott mennyisége (TKE g⁻¹) a krátertóból származó LS minta esetében mind R2A mind PYG táptalajon alacsonyabb volt, mint az 5900 m tszf magasságon fekvő olvadéktó üledékében (lásd 5.2. fejezet). A csíraszámbecslés során kapott értékek a krátertó üledékében alacsonyabbak voltak, mint más, hasonlóan nagy tengerszint feletti magasságban

(>4500m) található periglaciális környezetek esetében becsült csíraszám értékek (Zhang és mtsai, 2007b). Az alacsony TKE g⁻¹ értéket a környezet savas kémhatása okozhatja.

Az Ojos del Salado krátertavának üledékéből összesen 25 baktériumtörzset izoláltunk. R2A agaron összesen 2 filogenetikai törzs 3 nemzetségét sikerült tenyésztésbe vonnunk, ezek az *Arthrobacter*, a *Pseudarthrobacter* (Actinobacteria) és a *Marinobacter* (Proteobacteria) voltak. Az ARDRA csoportok szekvenálásra került reprezentatív képviselőinek és az NCBI adatbázisában legközelebbi rokon fajok típus törzsének 16S rRNS gén szekvencia alapján feltérképezett filogenetikai viszonyát ábrázoló neighbor-joining törzsfát a 22. ábrán mutatjuk be.



22. ábra Az Ojos del Salado krátertavának üledékéből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai, valamint a legközelebbi rokon fajok típus törzsének származási helye

Az azonosított tiszta tenyészetek túlnyomó többsége hideg-adaptált, pszichrofil fajokkal mutattot közeli rokonságot. Az Ojos del Salado legmagasabb krátertavából az *Arthrobacter* nemzetség négy fajtát, és a velük közel rokon *Pseudarthrobacter* nemzetség

egy képviselőjét is tenyésztésbe vontuk. A fakultatív anaerob *Arthrobacter livingstonensis* típus törzsét mohával takart talajról izolálták az antarktiszi Livingstone-szigeten. A baktérium -6 és 28 °C közötti hőmérsékleten képes növekedésre (Ganzert és mtsai, 2011). Az ugyanebbe a nemzetségbe tartozó *A. flavus* szintén fakultatív anaerob baktérium, melyet az antarktiszi Száraz-völgyekben található egyik tóból írtak le Reddy és mtsai (2000). A pszichrofil, 5 és 30 °C között növekedésre képes baktérium hőmérséklet toleranciájában hasonlít a nemzetség egy harmadik fajához, a koreai ginzengföldből izolált *A. ginsengisoli* fajhoz (Siddiqi és mtsai, 2014), melyet szintén izoláltunk a krátertóból. A nemzetség negyedik faja, mely előfordult a krátertavi üledékmintában az *Arthrobacter pityocampae* volt, ami a korábbiaktól eltérően egy mezofil baktérium (30 °C növekedési optimum; Ince és mtsai, 2014). Egyik általunk izolált *Arthrobacter* törzs sem volt szigorúan acidofil, noha mind az *A. ginsengisoli* és az *A. livingstonensis* fajok mutattak növekedést pH 4-en.

A kiszáradást jól toleráló *Pseudarthrobacter siccitolerans* (Actinobacteria) 15 és 35 °C közötti hőmérsékleten és pH 5,0-9,0 kémhatáson képes növekedni (Santacruz-Calvo és mtsai, 2013).

A Gammaproteobacteria osztály egyetlen képviselőjét, a hidegadaptált, mérsékelt halofil *Marinobacter guineae* baktériumfajt azonosítottuk. A Laguna Santa Rosa és Laguna Verde mintáiból is kimutatott faj típus törzsét az antarktiszi Déli Shetland-szigetéről izolálták (Montes és mtsai, 2008).

A Bacteroidetes törzsből egy fajt vontunk tenyésztésbe a krátertavi üledékből. A pszichrofil *Flavobacterium psychrolimnae* típus törzsét az antarktiszi Száraz-völgyek területéről írtak le (Van Trappen és mtsai, 2005).

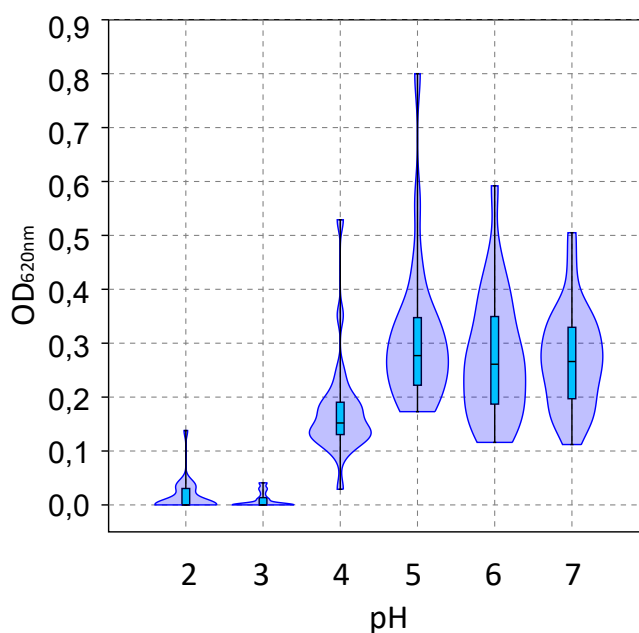
5.3.3 A kráterkörnyezetből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek pH toleranciája

A tenyésztésbe vont baktériumtörzsek közül 25-nek meghatároztuk a pH toleranciáját, a kapott eredményeket az 23. ábra összegzi. A krátertóból származó legtöbb baktériumtörzs képes volt növekedni savas kémhatáson (pH 4-5) is. A pH 2 és pH 3 kémhatású táplevesek esetében mért OD értékek átlaga a Mann-Whitney teszt alapján szignifikánsan különbözött ($p < 0,05$) a magasabb pH-ra beállított táplevesek esetében mért OD értékek átlagától, ami jelzi, hogy előzőekben nem volt számottevő növekedés.

Bár egy kivétellel minden törzs képes volt pH 4-en is növekedni, az ezen a kémhatáson mért OD értékek átlaga szignifikánsan alacsonyabb volt, mint amit a

magasabb kémhatásokon mértünk ($p < 0,05$), ami azt mutatja, hogy ilyen kémhatáson a növekedés elmarad a magasabb pH-n jellemző mértéktől.

A baktériumtörzsek 52%-ának pH 5 volt a növekedési optimuma, 28%-ának pedig pH 6. Csak 5 olyan tiszta tenyészet volt, ami a semleges pH-t részesítette előnyben. Az *A. pityocampae* és az *A. livingstonensis* fajok képviselői a vizsgált törzsek (PH1-3, RH2-1, PH2-1) alapján széles pH tolerancia tartománnyal rendelkeztek.



23. ábra Az Ojos del Salado krátertavából származó baktériumtörzsek pH toleranciája

Összességében elmondható, hogy a krátertó savas környezetéből származó baktériumtörzsek jól tolerálták a savasabb kémhatást is, ami jelzi, hogy a vulkáni tevékenység révén működő fumarolák hatással vannak a környezet baktériumközösségeinek ökológiai toleranciájára.

5.3.4 A kráterkörnyezet baktériumközösségeinek összetétele újgenerációs DNS szekvenálással

Az Illumina MiSeq újgenerációs DNS szekvenálással az Ojos del Salado kráteréből származó három üledékmintát vizsgáltunk: a krátertó üledékének (LS) baktériumközösségeit vetettük össze a kráterben található fumarolából fakadó meleg és savas vizű patak üledékével (a forrástól 20, illetve 50 m távolságra, FC-1, és FC-2).

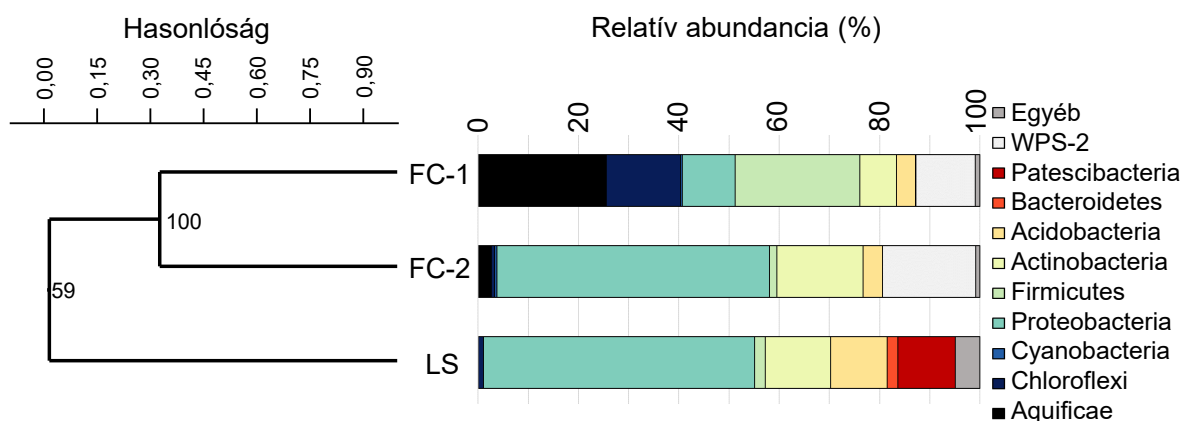
Összesen 151 909 szekvencia elemzését végeztük el, a legkevesebb szekvenciát (40 182) a krátertő üledékéből detektáltuk (LS). A kapott eredmények alapján számolt diverzitás mutatókat a szekvenálás további paramétereivel (vizsgált szekvenciák, filogenetikai törzsek, OTU-k száma) a 11. táblázat foglalja össze.

11. táblázat Az Ojos del Salado kráteréből származó minták újgenerációs DNS szekvenálással feltárt baktériumközösségeinek legfontosabb paraméterei és diverzitásindexei

Minta	Törzsek száma	Nemzetségek száma	OTU-k száma	Szekvenciák száma	Good's coverage	Shannon index	Inverz Simpson diverzitás
LS	20	105	139	40182	1	2,9	6,6
FC-1	21	90	184	51336	1	2,8	8,0
FC-2	15	77	126	60391	1	2,8	9,7

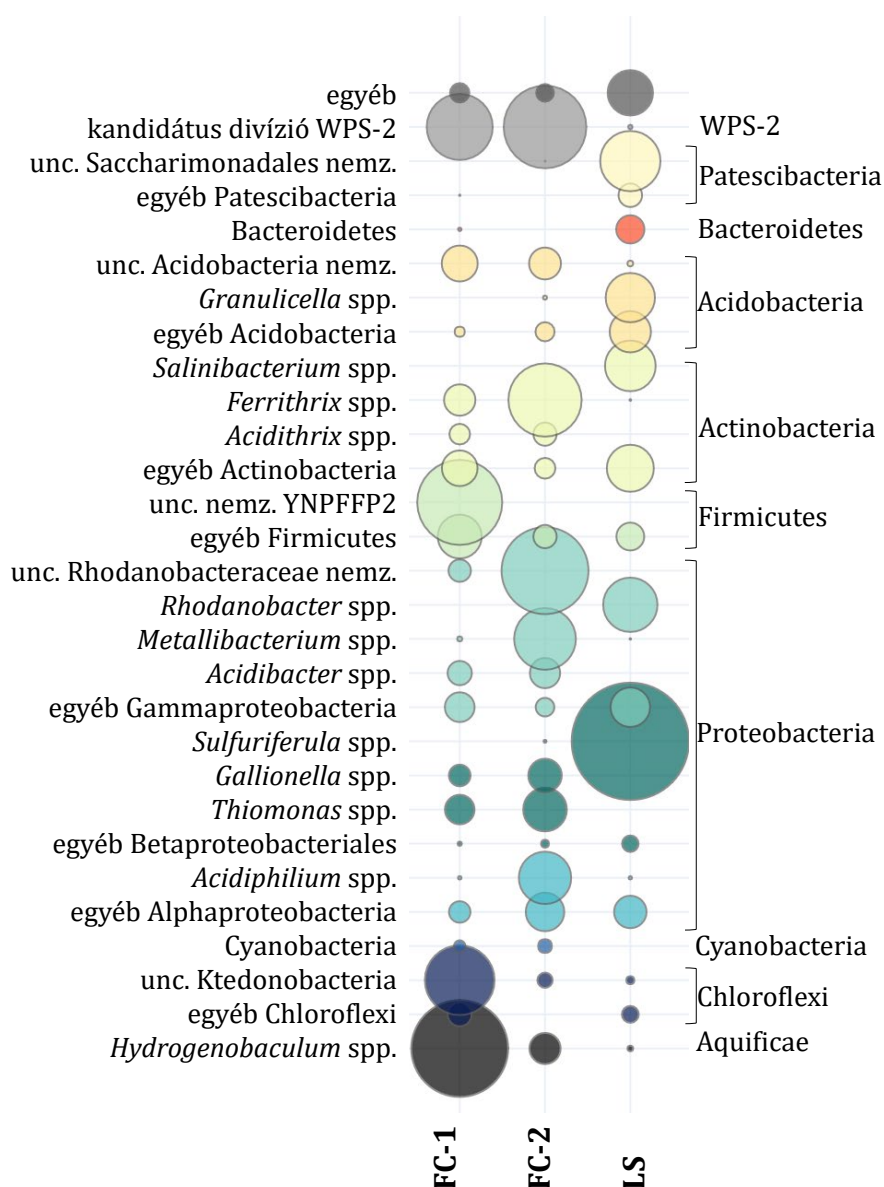
Az alfa diverzitás indexek alapján a krátertő, illetve a fumarolás patak üledékében a kimutatható taxonómiai diverzitás hasonló volt, a legkevesebb nemzetséget és OTU-t egyaránt az FC-2 mintából detektáltuk. A Shannon és inverz Simpson diverzitás indexek alapján a kráterből származó mintákban a szekvenciák megoszlása a taxonok között jellegzetesen kiegyensúlyozatlan, hiszen a szekvenciák nagy része sokszor néhány nemzetség között oszlik meg, amit később a 25. ábrán is látni fogunk.

A szekvenciák által lefedett génszakasz hossza lehetővé tette a nemzetség vagy annál magasabb taxonómiai szinten való besorolást. A filogenetikai törzsek egyes mintákra jellemző százalékos eloszlását, valamint a detektált OTU-k alapján meghatározott Bray-Curtis hasonlósági indexek felhasználásával készített hasonlósági dendrogramot a 24. ábra mutatja be.



24. ábra Az Ojos del Salado kráteréből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek összehasonlítása Bray-Curtis hasonlóságon alapuló UPGMA dendrogramon és a szekvenciák megoszlása a filogenetikai törzsek között

A vizsgált három mintában mindössze 10 filogenetikai törzs volt jelen legalább az egyik mintában >1% relatív abundanciával. Ebből a tavi üledékben 8, a fumarolás patak üledékében az FC-1 ponton 7, az FC-2 ponton 6 filogenetikai törzs fordult elő. Mindhárom üledékben jelen volt a Proteobacteria, az Acidobacteria, az Actinobacteria és a Firmicutes. A tavi üledékben nagy arányban fordultak elő a Patescibacteria törzsbe tartozó szervezetek, a fumarolás patak üledékében pedig az Aquificae képviselői, valamint a WPS-2 kandidátus divízió. Az amplikon szekvenciák eloszlását a legfontosabb taxonok között a 25. ábrán mutatjuk be.



25. ábra Az Ojos del Salado kráterének környezeteiből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségeinek összetétele

Nem csak a taxon-diverzitás, de a baktériumtaxonok eloszlása is nagymértékben különbözött a vizsgált minták között (25. ábra). Eredményeink megerősítik azt a korábbi vizsgálatok során levont következtetést, miszerint a kráterben a meleg- és hidegvizes környezetek baktériumközösségeinek filogenetikai diverzitása markánsan különbözik (Aszalós és mtsai, 2016). Az újgenerációs szekvenálás eredményei pedig az eddigi ismereteinkhez képest részletesebb képet adtak a vizsgált közösségekről.

Minden mintában előfordult a Proteobacteria törzs, legabundánsabb a krátertavi üledékben (LS, 54,1%) és a krátertóhoz közelebb eső pataküledékben (FC-2, 54,3%) volt. A Gammaproteobacteria osztály képviselői, köztük a Betaproteobacteriales rend tagjai voltak abundánsak (LS: 46%, FC-1: 41%, FC-2: 6%). Az Alphaproteobacteria osztály képviselői a legmelegebb mintában (FC-1) alacsony relatív abundanciával voltak jelen (1,2%), a többi környezetben 2,9-11,2%-os gyakorisággal voltak kimutathatóak. Az Actinobacteria törzs relatív abundanciája a kráterből származó mintákban 7,3 és 17,2% között volt. Az Aquificae törzs egyetlen mintában (FC-1, 25,5%) mutatott kiugróan magas dominanciát, ami, ahogy a későbbiekben látni fogjuk, egyértelműen a vulkáni működésnek köszönhető, csakúgy, mint a Firmicutes (FC-1, 24,9%), a Chloroflexi (FC-1, 14,7%) és a WPS-2 (FC-2, 18,6%) taxonok dominanciája a fumarola környezetében. A Patescibacteria superphylumot elsősorban a hideg vízzel átitatott üledékből (LS, 11,4%) detektáltuk.

A Bacteroidetes törzs csak minor csoportot képezett a krátertavi üledékben (2,2%), a fumarolából eredő patak üledékében pedig alig volt kimutatható (<1%).

Az alacsonyabb taxonómiai szintek (osztályok, családok vagy nemzetségek) tekintetében a meleg (FC-1, FC-2) és hideg vizes környezetből származó minták (LS) még inkább elkülönültek egymástól: az *Acidithrix* és a *Ferrithrix* nemzetségek (Actinobacteria), az *Acidibacter* és a *Metallibacterium* nemzetségek (Gammaproteobacteria), a *Gallionella* és a *Thiomonas* nemzetségek (Betaproteobacteriales) és az *Acidiphilum* (Alphaproteobacteria) nemzetség képviselői kizárólag a melegvizes, fumarolás patakból származó üledékmintákban fordultak elő, többnyire legalább 1% relatív abundanciával. A meleg és hideg vizes üledékminták esetében a közös domináns nemzetségek hiánya jelzi, hogy az ilyen elszigetelt és szélsőséges magashegyi vizes élőhelyek baktériumközösségei mennyire különbözőek lehetnek a lokálisan jellemző környezeti tényezők (esetünkben a vulkáni hatás nyomán jelentkező savas kémhatás és magasabb hőmérséklet) hatásainak köszönhetően.

5.3.5 A kráterkörnyezet baktériumközösségeinek összetétele hasonló élőhelyek diverzitásával

A *Hydrogenobaculum* nemzetség (mely az Aquificae törzs egyetlen képviselője a mintákban) a kráterből származó összes mintában jelen volt, de a hőmérséklettel párhuzamosan csökkent az abundanciája (legnagyobb arányban a legmelegebb mintában fordult elő). A nemzetség képviselői gyakoriak geotermikus környezetekben, dominánsak voltak a Yellowstone Nemzeti Park savas (pH 3,1) szulfátos-kloridos termálforrásaiban (63 °C; Donahoe-Christiansen és mtsai, 2004). Kimutatták, hogy a hipertermofil, obligát kemolitoautotróf baktériumokat magába foglaló taxon képviselői As^{3+} gyors oxidálására képesek (Donahoe-Christiansen és mtsai, 2004). A csoport relatív abundanciája általában a magasabb hőmérséklettel és az elérhető As^{3+} mennyiséggel pozitívan korrelál, míg a forrásoktól távolodva az As^{5+} gazdag részeken a *Thiomonas* és a *Methallosphaera* nemzetségek által alkotott mikrobiális bevonatok jönnek létre (Macur és mtsai, 2004). Az Ojos del Salado kráterében feltárt baktériumközösségek és a rendelkezésre álló vízkémiai adatok alapján a fumarolák környezetében hasonló közösségek fordulhatnak elő, mint a Yellowstone Nemzeti Park termálforrásainál, azonban ennek igazolására további vizsgálatok (pl. arzén jelenlét kimutatása) szükségesek.

Az FC-1 patak üledékéből feltárt baktériumközösségek diverzitása nagyfokú hasonlóságot mutatott a kelet-antarktiszi Mitchell-félsziget jégmentes sarki sivatagának talajából leírt baktériumközösségekkel: az enyhén savas (pH 4,8-6,8) talajokban a WPS-2 kandidátus törzs tagjai mellett a Ktedonobacteria osztály is domináns volt, míg a Bacteroidetes törzsre csak kevés szekvencia mutatott (Ji és mtsai, 2016). A Ktedonobacteria osztály képviselőit korábban más magashegyi vulkáni üledékekben, valamint antarktiszi fumarolás jégbarlangok környezetében is detektálták (Schmidt és mtsai, 2018, Tebo és mtsai, 2015). A WPS-2 törzs jelenlétét a gröndlandi jégtakaró kriokonitjaiból is kimutatták, ahol a különböző környezetekben detektált változatos relatív abundanciájának köszönhetően fontos szerepe volt a baktériumközösségek közötti variancia kialakításában (Cameron és mtsai, 2015).

A Száraz-Andok más vulkánjain (pl. Socompa, Lullaillaco) végzett mikrobiológiai vizsgálatok során feltárt baktériumközösségek főként a törzsek szintjén hasonlítottak az Ojos del Salado kráteréből leírt biodiverzitásra, a leggyakoribb nemzetségek között kevés egyezést tártunk fel (Costello és mtsai, 2009, Solon és mtsai, 2018). Az Ojos del Salado kráterében a fumarolák aktivitása savasabb kémhatást és magasabb hőmérsékletet

eredményez, mint a Socompa vulkán esetében (hiszen itt a meleg fumarola környezetében a kémhatás pH 6,73, a hőmérséklet 25 °C). A fumarolák környezetét biodiverzitás hotspotnak tekintették, hiszen lokálisan nagyobb diverzitásnak adnak otthont az egymástól elszigetelt környezetek. Ezzel szemben az Ojos del Salado kráterében található fumarolák által befolyásolt üledékekben a baktériumközösségek diverzitása (lásd Shannon index és inverz Simpson diverzitás, 11. táblázat) nem volt nagyobb, mint a vulkáni hatás által nem befolyásolt olvadéktó üledékében (lásd 5.2. fejezet).

Bár Costello és mtsai (2009) eredményei alapján a Socompa vulkán fumarolás üledékében a Verrucomicrobia képviselői voltak a legnagyobb arányban jelen, ez a törzs egyetlen fumarolás patakból származó üledékmintából sem volt kimutatható az Ojos del Salado esetében. Annak ellenére, hogy pontosan még nem ismert, hogy milyen környezeti tényezők szabályozzák ennek a törzsnek a jelenlétét, úgy tűnik, a talajokban közepes mélységben gyakoriak, hiszen 10-50 cm mélyen alkotnak domináns csoportot a közösségben (Bergmann és mtsai, 2011), ami megmagyarázza, hogy miért hiányoztak a fumarolás patak üledékéből vett felszíni (0-5 cm) minták közösségeiből.

5.3.6 *A fumarolás patak baktériumközösségeinek potenciális anyagszere diverzitása*

Az Ojos del Salado kráterében található fumarolás patak üledékéből leírt baktériumközösségek taxonómiai összetétele alapján létrehozott integrált geomikrobiológiai modell szerint a fumarolás patak savas környezetében egy teljes vas biogeokémiai ciklus működhet interakcióban a kén biogeokémiai ciklussal. A rendszer hasonló lehet ahhoz, amit Amils és mtsai (2007) írtak le a spanyolországi Tinto folyó (egy részletesen vizsgált Mars-analóg terület) savas üledékének baktériumközösségeiről, noha a közösségalkotó taxonok nem teljesen azonosak. A fumarolás patakban előforduló domináns nemzetségek (NGS során detektált szekvenciaszám alapján magas relatív-abundanciával jellemezhető nemzetségek) részt vehetnek a vas-ciklusban. Az FC-1 mintában a szekvenciák összesen 7,9%-a míg az FC-2 mintában 38,5%-a olyan baktériumfajokhoz mutatott hasonlóságot, melyek képesek ferrivas (Fe^{3+}) redukciójára, míg a detektált szekvenciák közül 8,0% (FC-1) és 20,7% (FC-2) olyan nemzetségek jelenlétére utalt, melyek a ferrovas (Fe^{2+}) oxidációjához járulhatnak hozzá. Összehasonlításképp, a hideg vizes mintában (LS) nem mutattunk ki 1%-nál nagyobb relatív abundanciával olyan taxont, amely részt vehet a vasciklusban.

Figyelembe véve, hogy a ferrivas alacsony pH-n oldott állapotban lehet található (Amils és mtsai, 2007), az eredmények megerősítik a savas kémhatás hajtotta vasciklus jelenlétét. A fumarola patak üledékéből és a hideg vizes tavi üledékből feltárt baktériumközösségek közötti különbségek alapján elmondható, hogy a fumarola aktivitása erős hatást gyakorol a baktériumközösség összetételén keresztül a közösségek biogeokémiai ciklusokban betöltött szerepére.

Míg az oldott ferrisav redukcióját néhány domináns nemzetség képviselői (pl. *Ferrithrix*, *Acidiphilium*, *Metallibacterium*) képesek aerob és anoxikus környezetben egyaránt végbevenni, más nemzetségek tagjai (pl. *Acidibacter*) csak oxigén jelenlétében tudnak szaporodni (Johnson és mtsai, 2009, Wichlacz és mtsai, 1986, Ziegler és mtsai, 2013, Falagán és Johnson, 2014). A minták elemzése során detektált vas-oxidáló baktériumoknak kevesebb típusa fordult elő a környezetben a vasredukálókhoz képest, főként a *Gallionella* és a *Ferrithrix* nemzetség tagjai, valamint alacsony relatív abundanciájú taxonok képviselői tartoztak ide. A vasredukálók legtöbb képviselője az obligát heterotrófok közé sorolható, azonban a környezetben viszonylag nagy arányban fordultak elő (fakultatív) autotróf nemzetségek képviselői is (pl. *Gallionella* 1,0% és 3,0%, *Hydrogenobaculum* 25,5% és 2,6%, *Thiomonas* 2,4% és 5,2%, az FC-1 és FC-2 mintákban). Az általuk előállított szerves szénvegyületek teszik lehetővé a feltárt heterotróf diverzitás fenntartását, melybe olyan acidofil heterotróf nemzetségek képviselői is beletartoznak, melyek nem vesznek részt közvetlenül a vas vagy a kén oxidációs-redukációs folyamataiban (pl. *Acidotherrmus*, *Aquisphaera*, *Acidisphaera*, *Terracidiphilus* [Mohagheghi és mtsai, 1986, Bondoso és mtsai, 2011, Hiraishi és mtsai, 2000, García-Fraile és mtsai, 2016]).

A krátertó és fumarolás patak üledékmintáiban előfordultak olyan baktérium nemzetségek képviselői, melyek részt vehetnek a szervetlen kénvegyületek oxidációs vagy redukációs folyamataiban (31,0% az FC-1 és 9,4% az FC-2 mintában). A legnagyobb relatív abundanciával előforduló nemzetségek mellett (*Hydrogenobaculum* és *Thiomonas*) néhány, kevesebb reprezentánssal jelen lévő kén-oxidáló csoport is előfordult (*Acidithiobacillus*, *Acidiferrobacter*, *Acidibacillus* és *Alicyclobacillus* [Moreira és Amils, 1997, Valdés és mtsai, 2008, Hallberg és mtsai, 2011, Holanda és mtsai, 2016, Wisotzkey és mtsai, 1992]). Legtöbbjükről ismert, hogy a vas oxidációban is szerepük van. Bár alacsony relatív abundanciával, de a szulfát-redukáló baktériumok (SRB) egy csoportját, a *Desulfosporosinus* nemzetséget (Stackebrandt és mtsai, 1997) is sikerült kimutatni.

Számos azonosított nemzetség (*Metallibacterium*, *Acidibacter*, *Gallionella*, *Thiomonas*, *Ferrithrix*, *Acidithrix*, *Acidiphilium*, *Hydrogenobaculum*) abundáns volt, vagy kizárólag a meleg-vizes fumarolás patak üledékeiben (FC-1, FC-2) volt jelen, ami azt mutatja, hogy a savas környezet a biogeokémiai ciklusokhoz úgy járul hozzá, hogy szelektíven hat a baktériumközösségek összetételére. Több savas Mars-analóg terület baktériumközösségének összetételét vizsgálták korábban, köztük a Tinto folyót is, ahol a vas ciklusban szerepet játszó extremofil baktériumok jelenlétét mind a vízoszlopban, mind a folyó üledékéből kimutatták (Amils és mtsai, 2007, Sánchez-Andrea és mtsai, 2011, Sánchez-Andrea és mtsai, 2012). Bár a feltárt baktériumközösségek számos összetevője megegyezik az általunk vizsgált mintákra jellemző közösség egyes alkotóival, a Tinto folyó esetében az acidofil autotrófok közül a *Leptospirillum*, míg a kráterben található patak üledékében kizárólag a *Gallionella* nemzetség képviselői fordultak elő. Továbbá az Ojos del Salado kráterében az Aquificae és Acidobacteria képviselőit is azonosítottuk – ezeket a törzseket a Tinto folyó környezetében ez idáig nem detektálták. A hasonlóságok között említhetjük meg, hogy az *Acidithiobacillus* és az *Acidiphilium* nemzetségeken túl a *Desulfosporosinus* jelenlétét is kimutatták a Tinto folyóból Sánchez-Andrea és mtsai (2012), akik arra a megállapításra jutottak, hogy a szulfátredukáló baktériumok arányát a pH az oldott ferrivas mennyiségén keresztül befolyásolhatja.

Az *Acidiphilium* nemzetség tagjait szintén megtalálták más Mars-analóg területeken is, például a costa ricai Poás vulkánon található ultrasavas tó (pH -1-1,5), a Laguna Caliente vizében, ahol a szélsőségesen leegyszerűsödött (mindössze néhány OTU alkotta) közösség egyetlen baktérium nemzetsége volt (Hynek és mtsai, 2018).

6 Következtetések

A Puna de Atacama-fennsík és az Ojos del Salado vulkán vizes élőhelyeinek vizsgálata során tenyésztési és tenyésztéstől független molekuláris biológiai módszerekkel tártuk fel a baktériumközösségek filogenetikai diverzitását. Célunk volt, hogy a hegyi sivatagi klíma baktériumközösségekre gyakorolt hatásai mellett a földrajzilag egymáshoz viszonylag közel található, ám fizikai és kémiai tulajdonságaikban nagymértékben különböző élőhelyekre jellemző taxondiverzitást, és az alapján valószínűsíthető anyagsere diverzitást összehasonlítsuk.

A Laguna Santa Rosa üledékében és a Laguna Verde mikrobiális bevonataiban, egy 5900 m tszf magasságon fekvő permafroszt olvadéktó vizében, üledékében és a környező permafroszt üledékben, valamint az Ojos del Salado mellékráterének tavában és fumarola patak üledékében előforduló baktériumközösségeket elemeztük.

Vizsgálataink eredményeképpen megállapítottuk, hogy a tengerszint feletti magassággal és az élőhelyek extremitásának fokozódásával párhuzamosan csökkent a kimutatott bakteriális taxon-diverzitás. Az olvadéktó üledékében például kb. ötször nagyobb volt a detektált OTU-k száma, mint a krátertó savas környezetében. A sós tavakban a legnagyobb limitációt az alacsony vízaktivitás és az erős besugárzás jelentette. A permafroszt tó környezetére is jellemző volt az intenzív sugárzás, de az alacsony hőmérséklet és különösen a permafroszt üledékek felszíni rétegében a nagy szárazság volt jellemző. Nem csak az alacsony hőmérséklet és a folyékony halmazállapotú víz korlátozott jelenléte, hanem a nagy hőingásnak köszönhető rendszeres fagyás-olvas és kiszáradási ciklusok is befolyással voltak a baktériumközösségek összetételére. A krátertóban és főként a fumarolás patakban mindezek mellé társult a környezet alacsony pH-ja. Az újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek összetételét az adott környezetre jellemző szelekciós hatások alakították, így tavanként és mintatípusonként karakteresen különbözött a baktériumközösségek filogenetikai- és potenciális anyagsere diverzitása. Ez az eredmény összhangban volt a tenyésztési vizsgálatok során a különböző környezetekből izolált törzsek egyes paraméterekre (NaCl koncentráció vagy pH) mutatott ökológiai toleranciájával is.

Vizsgálataink az extrémofil vagy poliextremofil baktériumok jelenlétét is megerősítették a tanulmányozott magashegyi vizes élőhelyeken. A Puna de Atacama-fennsík magashegyi sós tavaiban a magas sókoncentrációt jól toleráló, halofil és

halotoleráns szervezetek fordultak elő. A permafroszt olvadéktó környezetéből pszichrofil és pszichrotróf baktériumokat detektáltunk, a közösség számos tagja jellemzően oligotróf szervezet volt. A kráter savas vízzel átitatott üledékéből molekuláris módszerekkel acidofil és pszichrofil taxonokat is kimutattunk. Az extremofil baktériumközösségek összetételét a hegyi sivatagi klíma jellegzetességei (nagy hőingás, szárazság), a nagy tengerszint feletti magasságnak tulajdonítható körülmények (pl. intenzív UV sugárzás, alacsony átlaghőmérséklet) és a vulkáni működés (fumarolák által okozott savas kémhatás) egyaránt befolyásolta, amit tenyésztéses és molekuláris módszerekkel végzett vizsgálatainkkal egyaránt alátámasztottunk.

Rámutattunk arra is, hogy mindegyik magashegyi vizes élőhelyen az általános tavi környezetekhez képest leegyszerűsödött, viszonylag kevés taxon alkotta baktériumközösségek voltak jellemzők. A Laguna Santa Rosa üledékében, valamint a Laguna Verde mikrobiális bevonatában és vizében legnagyobb relatív abundanciával a Proteobacteria és Bacteroidetes törzsek képviselői fordultak elő, melyek sós tavi környezetek jellemző baktériumai. Gyakori volt még a Firmicutes, valamint a Laguna Verde esetében a Cyanobacteria, a Parcubacteria és a Chloroflexi is. A feltárt közösségek elsősorban a Száraz-Andok más magashegyi sós környezetekben (pl. Salar de Coposa, Salar de Puja), vagy a Tibeti-fennsík magashegyi sós tavaira jellemző baktériumközösségekre hasonlítottak. Bár a filogenetikai törzsek szintjén más magashegyi sós tavakkal számos hasonlóság felfedezhető, alacsonyabb rendszertani kategóriák között több eltérést is találtunk, például a domináns nemzetségek környezetenként változnak.

Az Ojos del Salado permafroszt olvadéktavának baktériumközösségeit különféle periglaciális környezetekre jellemző taxonok alkották (pl. Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria). A főkomponens analízis eredményei alapján a víz, a tavi üledékek, a permafroszt felső rétegéből származó üledékek és a permafrosztból 10 cm mélyről származó üledékek baktériumközösségei között nagyfokú változatosság áll fenn. Ez alapján azt feltételezzük, hogy a különféle üledékmintákra jellemző baktériumközösségeket az erős besugárzás, a sorozatos fagyás-olvadás ciklusok és az üledék sorozatos kiszáradási ciklusai által jelentett szelekciós tényezők alakítják. A feltárt közösségek taxondiverzitása nagy mértékben hasonlított például a Száraz-Andok Socompa és Llullaillaco vulkáni környezetéből, valamint a Nunavut permafroszt láp területén leírt baktériumközösségekhez.

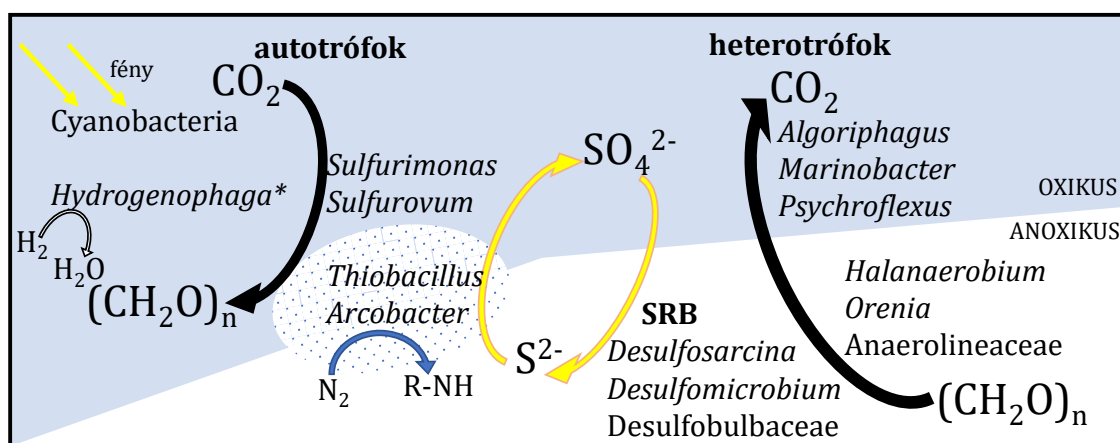
A kráter környezetében is gyakori volt a Proteobacteria és az Actinobacteria törzsek képviselőinek előfordulása, azonban az olvadéktóval szemben itt a Bacteroidetes

törzs tagjai csak minor csoportot képeztek. A meleg- és hideg vízzel átitatott üledékek közösségei markánsan különböztek egymástól, a fumarolákból eredő patak üledékében az Aquificae, a WPS-2, a Firmicutes és a Chloroflexi fordult elő, míg a tavi üledékben a Patescibacteria superphylum jelenléte volt jellemző. A különbség az alacsonyabb taxonómiai szintek tekintetében méginkább megfigyelhető volt: az *Acidithrix*, *Ferrithrix*, *Hydrogenobaculum*, *Acidibacter*, *Metallibacterium*, *Gallionella*, *Thiomonas* és *Acidiphilum* nemzetségek inkább a meleg környezetekben, mások pl. *Granulicella*, *Sulfuriferula* és *Rhodanobacter* főként a hideg vizes mintában fordultak elő. A feltárt baktériumközösségek a 6480 m tszf-en fekvő krátertő esetében leginkább grönlandi poláris jégtakarón előforduló kriokonitok és más Száraz-Andokban található vulkánok (Socompa, Llullaillaco) permafroszt üledékre jellemző baktériumközösségekre hasonlítottak. A fumarolákból eredő patak üledékében az antarktiszi Mitchell-félsziget enyhén savas permafroszt üledékében előforduló közösségekre, és a Yellowstone Nemzeti Park meleg forrásainak környezetében képződő biofilmekre emlékeztető baktériumközösségeket tártunk fel.

Az újgenerációs szekvenálással nyert adatok elemze során nagy arányban mutattunk ki ez idáig ismeretlen baktériumfajokhoz és kandidátus taxonokhoz sorolható szekvenciákat. A 16S rRNS gén szekvencia 97%-os hasonlóságát figyelembe véve a még tenyésztésbe nem vont, kandidátus nemzetségbe tartozó baktériumfajokra utaló szekvenciák aránya az összes vizsgált környezetben számottevő volt. A két sós tóban a Gracilibacteria, a Firmicutes és a Bacteroidetes törzsek tenyésztésbe nem vont nemzetségei fordultak elő legnagyobb arányban. Minden sós tavi mintában jelen volt, és a Laguna Verde egyik bevonatában kiugróan magas relatív abundanciát mutatott a Parcubacteria phylum, melynek ezidáig egyetlen tenyésztésbe vont képviselője sem ismert. Az olvadéktó üledékmintáiban mintánként a szekvenciák minimum 46%-a mutatta a legnagyobb hasonlóságot kandidátus taxonnal. Egyes domináns nemzetségek is uncultured vagy unclassified taxonba tartoztak. Az olvadéktó esetében az ilyen ismeretlen szekvenciák a Patescibacteria, az Acidobacteria, az Actinobacteria, a Bacteroidetes, a Chloroflexi, a Gemmatimonadetes, a Planctomycetes, a Proteobacteria vagy a Verrucomicrobia törzsek tagjai voltak. A krátertő üledékében és a fumarolás patakban is nagy arányban voltak ismeretlen baktériumfajok. Ezekből a mintákból összesen hat kandidátus törzs, superphylum vagy divízió (Dependentia, Rokubacteria, Gracilibacteria, Microgenomatia, Parcubacteria, Patescibacteria és WPS-2) volt kimutatható. A WPS-2 divízió kiugróan magas relatív abundanciát mutatott a melegvízzel átitatott

pataküledékekben. Ezek az eredmények összhangban vannak a Száraz-Andok más területein végzett vizsgálatok eredményeivel, megerősítve azt az elképzelést, hogy az Ojos del Saladohoz hasonló elszigetelt magashegyi vizes élőhelyekre jellemző lokális biodiverzitás „hotspotok” ezidáig ismeretlen mikroorganizmusoknak adnak otthont. Mivel az ilyen poliextremofil szervezetek biotechnológiai vagy ipari célú alkalmazhatóságuk révén nagy érdeklődésre tarthatnak számot, ezek az eredmények felhívják a figyelmet a terület jelentőségére.

A feltárt taxondiverzitás alapján négy integrált modellt hoztunk létre, melyekben összegeztük a baktériumközösségek azonosított tagjainak a szén, a kén, a nitrogén és a vas biogeokémiai ciklusában betöltött lehetséges szerepét a vizsgált élőhelyeken (26., 27., 28., 29. ábra). A feltárt taxonösszetétel és irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a vizsgált négy élőhelyen a baktériumközösségeket változatos és egymástól jól elkülöníthető anyagcsere sokféleség jellemzi.

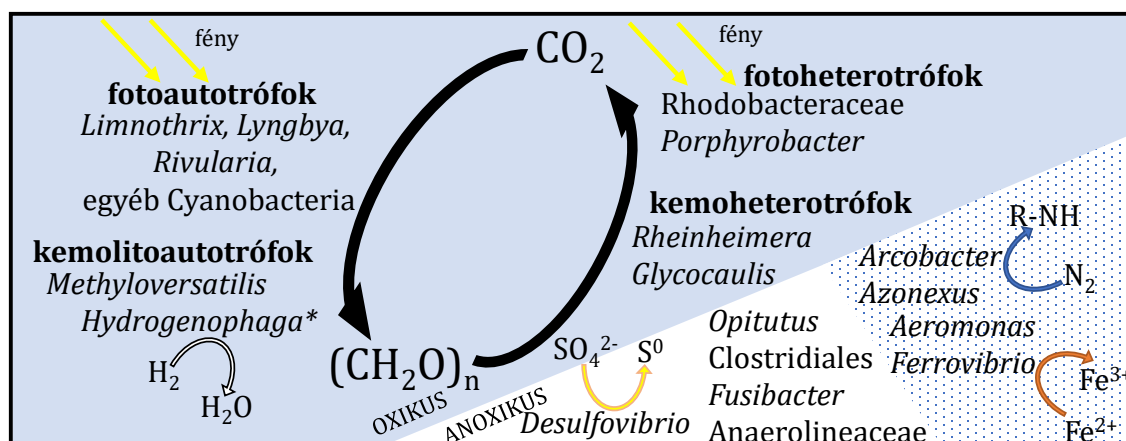


26. ábra A Laguna Santa Rosa sós tó üledékéből azonosított baktériumok feltételezett részvétele az elemek (C, N, S) biogeokémiai körfolyamataiban

(Rainey és mtsai, 1995, Elferink és mtsai, 1999, Bowman és mtsai, 2003, Inagaki és mtsai, 2003, Inagaki és mtsai, 2004, Kämpfer és mtsai, 2005, Moussard és mtsai, 2006, Thevenieau és mtsai, 2007, Montes és mtsai, 2008, Yoon és mtsai, 2009, Abdeljabbar és mtsai, 2013)

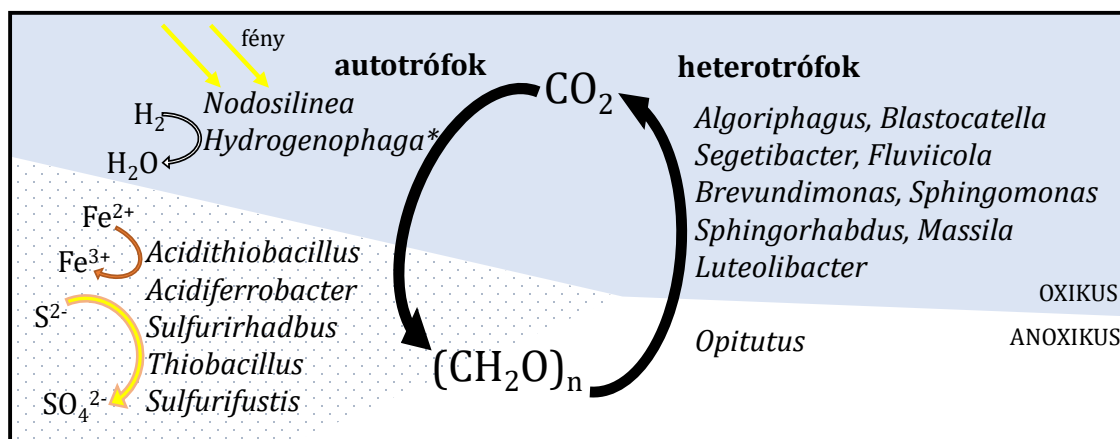
A Laguna Santa Rosa üledékében anaerob baktériumok változatos csoportja fordult elő, közöttük heterotróf fermentálókat (pl. *Orenia*, *Halanaerobium*) és szulfát-redukálókat (pl. *Desulfomicrobium*, *Desulfosarcina*) egyaránt kimutattunk (26. ábra). A kemolitotrófok között is akadtak mikroaerofil vagy fakultatív anaerob nemzetségek, például a *Thiobacillus* vagy a nitrogénfixációra is képes *Arcobacter*. Az autotróf szervezetek között a kemolitoautotróf anyagcserét folytatók egyértelmű dominanciája fedezhető fel, a kén-oxidálók (*Sulfurovum*, *Sulfurimonas*, *Thiobacillus*) jelenléte arra utal, hogy a vizsgált környezetben a lokális kén-ciklus, ún. szulfurétum működhet. Ez a Laguna

Verde bevonatáról a kénoxidálók, az olvadéktavi üledékről pedig a szulfát-redukálók hiánya miatt nem mondható el.



27. ábra A Laguna Verde sós tó biofilmjéből azonosított baktériumok feltételezett részvétele az elemek (C, N, S, Fe) biogeokémiai körfolyamataiban (Stackebrandt, 1993, Ravot és mtsai, 1999, Chin és mtsai, 2001, Moore és Brettar és mtsai, 2002, Kämpfer és mtsai, 2005, Moussard és mtsai, 2006, Saha és Chakrabarti, 2006, Kaluzhnaya és mtsai, 2006, Sorokina és mtsai, 2012, Abraham és mtsai, 2013).

A vizsgált élőhelyek közül a Laguna Verde bevonataiban voltak legnagyobb arányban jelen fototróf szervezetek (27. ábra). A fotoautotróf cianobaktériumok mellett két fotoheterotróf csoportot, a *Porphyrobacter* nemzetség és *Rhodobacteraceae* család képviselőit azonosítottuk. Előbbi csoport jelenléte mindegyik vizsgált élőhelyen kimutatható volt, még ha esetenként kis arányban is fordultak elő. Fotoheterotróf taxonokat viszont kizárólag ebből a sós tavi bevonatból mutattunk ki. A kemoheterotróf szervezetek között aerob és (fakultatív) anaerob baktériumok szekvenciáit egyaránt sikerült azonosítanunk. Változatos anyagcsere jellemezte őket, előfordultak köztük szulfát-redukáló (*Desulfovibrio*), nitrogénfixáló (*Arcobacter*, *Azonexus*) valamint vas-oxidáló (*Ferrovibrio*) nemzetségek egyaránt. A Laguna Verde melegvizes medencéjéből származó bevonatmintában nem meglepő módon nagy arányban voltak jelen a biofilmképzésben szerepet játszó nemzetségek tagjai, például az elsődleges kolonizálóként ismert *Rhodobacterales* rend és a már említett (és a Laguna Santa Rosa üledékében is előforduló) *Arcobacter* nemzetség tagjai is.



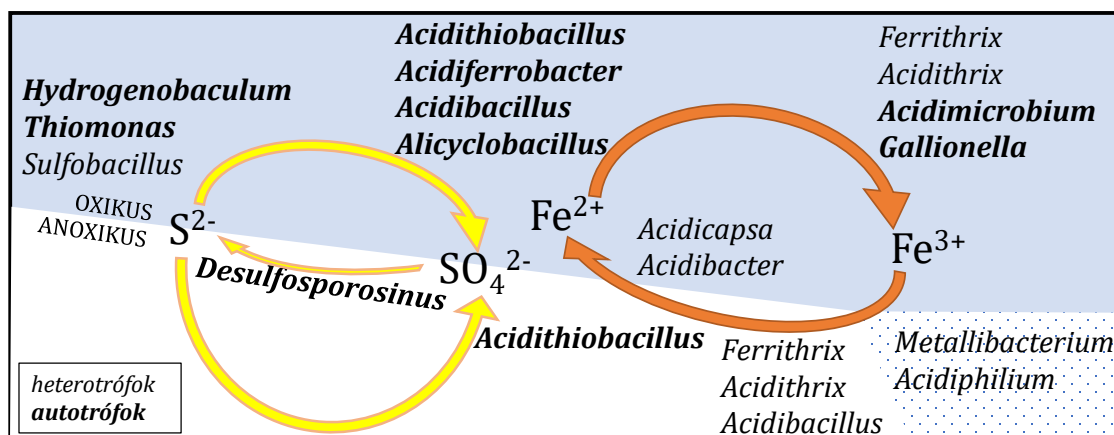
28. ábra Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékéből azonosított baktériumok feltételezett részvétele az elemek (H, C, S, Fe) biogeokémiai körfolyamataiban

(Bowman és mtsai, 2003, Busse és mtsai, 2003, Kämpfer és mtsai, 2005, O'Sullivan és mtsai, 2005, An és mtsai, 2007, Valdés és mtsai, 2008, Abraham és mtsai, 2010, Hallberg és mtsai, 2011, Perkerson III és mtsai, 2011, Jiang és mtsai, 2012, Jogler és mtsai, 2013, Shen és mtsai, 2015, Kojima és mtsai, 2015, Watanabe és mtsai, 2016, Boden és mtsai, 2017, Huber és mtsai, 2017)

Az olvadéktavi üledék közösségében változatos anyagcserére képes autotróf taxonokat mutattunk ki (28. ábra). A fotoszintetizáló *Nodosilinea* nemzetség mellett számos kemolitoautotróf volt jelen az üledékben, melyek hidrogén (*Hydrogenophaga*), vas (*Acidithiobacillus*, *Acidiferrobacter*) vagy kén (*Sulfurirhabdus*, *Thiobacillus*, *Sulfurifustis*) oxidálására képesek. A mintákból anaerob szervezeteket csak elvétve mutattunk ki (pl. *Opitutus*) ami arra utal, hogy az olvadéktó teljesen felkeveredik a területre jellemző erős szélnek köszönhetően, így az üledék felső része aerob környezetnek tekinthető. Ez magyarázatul szolgálhat a szulfát-redukáló baktériumok hiányára is.

A kráterben található savas vízü patak üledékéből feltárt baktériumközösség alapján feltételezhető, hogy a környezetben a vas biogeokémiai ciklusa interakcióban működik a kén biogeokémiai ciklussal (29. ábra). Mivel savas kémhatáson a ferrivas (Fe^{3+}) oldott állapotban található, az alacsony pH elősegítheti a vasciklus működését. A környezetben elérhető ferrivas jelenlétére utal, hogy az üledékben vasredukáló baktériumok számos csoportját kimutattuk. Közöttük aerob (*Acidicapsa*, *Acidibacter*), anaerob (*Ferrithrix*, *Acidithrix*, *Acidibacillus*) és fakultatív anaerob (*Metallibacterium*, *Acidiphilium*) szervezetek egyaránt előfordultak. Vasredukálók jelenlétét a többi vizsgált környezetből nem sikerült kimutatnunk. Számos vasoxidálásra képes szervezetet mutattunk ki (pl. *Acidimicrobium*, *Gallionella*), köztük voltak kénoxidáló nemzetségek (pl. *Acidiferrobacter*, *Alicyclobacillus*), és olyan nemzetségek tagjai is, melyek nem csak a redukált ferrovas (Fe^{2+}) és kén oxidálására, de a ferrivas elektron akceptorként való

hasznosítására is képesek (*Acidithiobacillus*, *Acidibacillus*). Csak kevés szekvencia utalt jelenlétére, de egy szulfát-redukáló nemzetséget (*Desulfosporosinus*) is azonosítottunk a pataküledékben.



29. ábra Az Ojos del Salado kráterében található fumarolás patakból azonosított baktériumok feltételezett részvétele a vas és a kén biogeokémiai körfolyamataiban (Hanert, 1981, Wichlacz és mtsai, 1986, Wisotzkey és mtsai, 1992, Norris és mtsai, 1996, Stackebrandt és mtsai, 1997, Moreira és Amils, 1997, Stohr és mtsai, 2001, Valdés és mtsai, 2008, Johnson és mtsai, 2009, Hallberg és mtsai, 2011, Kulichevskaya és mtsai, 2012, Ziegler és mtsai, 2013, Falagán és Johnson, 2014, Jones és Johnson, 2015, Holanda és mtsai, 2016)

A Laguna Santa Rosa üledékéből és a Laguna Verde vizéből és bevonataiból, az olvadéktó üledékéből, valamint a kráter vizes környezeteinek üledékéből tenyésztési- és molekuláris módszerekkel feltárt taxondiverzitás alapján egyes jellemző anyagcsere folyamatokra tudtunk következtetni. A közösségalkotó taxonok tényleges aktivitásának, részletes metabolikus diverzitásának, valamint a biogeokémiai ciklusokban betöltött pontos szerepének tisztázására azonban még további (pl. metagenomikai, transzkriptomikai) vizsgálatokra volna szükség. Az eredmények értékelése során felmerült kérdések megválaszolásához szükséges volna a vizsgált környezet fizikai-kémiai karakterének pontosabb ismerete, további környezeti változók (pl. arzén, teljes foszfor, teljes nitrogén stb.) vizsgálata is.

Tovább lépési lehetőség ezen kívül a tenyésztési eljárások továbbfejlesztése, a környezeti feltételek laboratóriumi modellezésével és optimalizálásával az ezidáig ismeretlen baktériumfajok tenyésztésbe vonása, az izolált törzsek ökológiai toleranciájának vizsgálata pl. UV sugárzásra, hőmérsékletre.

Végül, de nem utolsó sorban nyitott kérdés maradt még az Ojos del Salado környéki vizes élőhelyeken előforduló Archaea vagy Eukarya doménbe tartozó mikroorganizmusok diverzitásának feltárása is.

7 Összefoglalás

A Puna de Atacama-fennsík (Száráz-Andok) egy különleges hegyi sivatag, ahol a nagy tengerszint feletti magasságnak, a permafrosztnak és az aktív vulkanizmusnak köszönhetően változatos fizikai-kémiai tulajdonságokkal jellemezhető vizes élőhelyeket találunk, melyek kiváló lehetőséget adnak extremofil baktériumközösségek vizsgálatára. A fennsíkon magashegyi sós tavak (Laguna Santa Rosa, 3770 m és Laguna Verde, 4350 m) fordulnak elő, míg a területen található Ojos del Salado vulkánon 5900 m tszf magasságban permafroszt degradáció révén keletkező sekély, oligotróf olvadéktavak, a 6480 m-en lévő mellékráterben pedig fumarolák aktivitásának eredményeként egy savas vizű krátertó fekszik. Ezen szélsőséges élőhelyek mikrobiológiai diverzitásáról alig rendelkezünk ismeretekkel, pedig a terület különleges természetes laboratórium, hiszen ilyen nagy tengerszint feletti magasságon nagyon ritkán fordulnak elő olvadéktavak, vagy meleg, savas környezetek.

Célunk volt, hogy tenyésztési és molekuláris biológiai (DGGE és NGS) módszerekkel feltárjuk a Puna de Atacama-fennsík és Ojos del Salado vulkán vizes élőhelyein előforduló baktériumközösségek taxonómiai diverzitását.

A mintavétel 2016 februárjában történt a Magyar Száráz-Andok Kutatási Program keretében. A tenyésztés során megállapított csíraszámok és tenyészthető diverzitás, valamint NaCl-re vagy pH-ra adott tolerancia között élőhelyenként nagyfokú különbségeket mutattunk ki a vizsgált környezetekre jellemző változatos fizikai-kémiai paramétereknek, az adott minta típusának és származási helyének függvényében. A vizsgált vizes élőhelyeken molekuláris módszerekkel nagy arányban voltak kimutathatók ez idáig tenyésztésbe még nem vont baktérium filotípusok.

A két sós tó, a Laguna Santa Rosa üledékében és a Laguna Verde melegvizes medencéjének mikrobiológiai bevonatában élő baktériumközösségek újgenerációs szekvenálási eredményei arra utaltak, hogy a legnagyobb arányban előforduló Proteobacteria és Bacteroidetes törzsek mellett az alacsonyabb abundanciával jelen lévő taxonok (pl. Parcubacteria, Firmicutes) is jelentősen hozzájárulnak a minták közötti varianciához. A Laguna Verde bevonatában nagy arányban fordultak elő fototróf szervezetek, a Laguna Santa Rosa üledékében pedig nagy volt az anaerob baktériumok diverzitása.

Kutatásunk során megvizsgáltuk, milyen hatással van az olvadéktó jelenléte a baktériumközösségek diverzitására, így egy gradiens mentén vett mintákból elemeztük az olvadéktó vizét, üledékét, valamint a tóparttól távolodva a felszíni és a 10 cm mélyről származó permafroszt üledéket. A Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Patescibacteria törzsek által dominált közösségek nagyfokú változatosságot mutattak, a legkisebb taxon-diverzitást a vízből, a legnagyobbat a 10 cm mélyről származó permafroszt üledékből tártuk fel. Az azonosított baktériumtaxonok változatos anyagszere tulajdonságokkal jellemezhetőek, kemolitotróf, fototróf és heterotróf fajok egyaránt előfordultak közöttük.

A krátertó környezetéből különböző kémhatású (pH 2,1 és 4,9) és hőmérsékletű (40,8, 34,7 és 3,8 °C) környezetből származó üledékek baktériumközösségeit hasonlítottuk össze egymással. Az alacsony diverzitással jellemezhető, kevés OTU alkotta közösségek szerkezete markánsan különbözött a hideg és meleg vízzel átitatott üledékekben. A fumarolás patak savas üledékéből főként a vas és a kén biogeokémiai ciklusában résztvevő nemzetségeket azonosítottunk.

8 Abstract

The Puna de Atacama plateau (Dry Andes) is a unique mountain desert where the high-altitude, the presence of permafrost and active volcanism contribute to the formation of special aquatic environments with various physical-chemical characters, suitable to study communities of extremophilic bacteria. High-altitude saline lakes (e.g. Laguna Santa Rosa or Laguna Verde, 3770 and 4350 m a.s.l., respectively) can be found here along with a shallow oligotrophic thaw pond originating from degrading permafrost at 5900 m a.s.l. and the highest crater lake of the Ojos del Salado volcano at 6480 m a.s.l., with acidic water due to fumarolic activity. Although the area is a special natural laboratory, since thaw ponds and warm, acidic environments are rare at this altitude, our knowledge about the microbial ecology of these extreme environments is sparse.

Our aim was to reveal taxonomic diversity of bacterial communities in the aquatic environments of the Puna de Atacama plateau and Ojos del Salado volcano using cultivation and molecular methods (DGGE and NGS).

Samplings took place in February 2016 during the expedition of the Hungarian Dry-Andes Research Programme. The estimated number of the colony forming units, the cultivable diversity and the tolerance for NaCl or pH were different in each assessed habitat, which is attributable to the various physical-chemical properties of the studied environments, the type or place of origin of the samples. Molecular methods revealed high abundance of hitherto uncultured phylotypes in the studied lakes and sediments.

Next-generation sequencing of sediment samples from Laguna Santa Rosa and microbial biofilm samples from Laguna Verde showed that besides the dominant phyla of Proteobacteria and Bacteroidetes, minor taxa (e.g. Parcubacteria, Firmicutes) also contributed to the variance among communities. In the Laguna Verde samples phototrophic bacteria were abundant, while Laguna Santa Rosa sediments harboured high diversity of anaerobes.

Bacterial communities in the environment of the thaw pond were examined along a gradient by assessing lake water, sediment and permafrost samples from the surface and 10 cm depth in order to reveal how the presence of the thaw pond affects the community structure. Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia and Patescibacteria were the main phyla explored. The most diverse community was revealed

from the subsurface permafrost sediment. Among the detected taxa, representatives of chemolithoautotrophs, photoautotrophs and heterotrophs were present.

In the crater environments, bacterial communities revealed from acidic (pH 2.1 and 4.9) sediments saturated with warm (40.1, 34.7 °C) or cold (3.7 °C) water were compared. Although these environments consisted of only a low number of OTUs, the taxonomic diversity was characteristically different in the warm and cold water saturated sediment. In the warm and acidic fumarolic creek sediment, genera participating in the iron and sulfur biogeochemical cycles were detected.

9 Irodalomjegyzék

- Abdeljabbar, H., Cayol, J. L., Hania, W. B., Boudabous, A., Sadfi, N., & Fardeau, M. L. (2013).** *Halanaerobium sehlinense* sp. nov., an extremely halophilic, fermentative, strictly anaerobic bacterium from sediments of the hypersaline lake Sehline Sebkhia *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:2069-2074.
- Abraham, W. R., Estrela, A. B., Nikitin, D. I., Smit, J., & Vancanneyt, M. (2010).** *Brevundimonas halotolerans* sp. nov., *Brevundimonas poindexteriae* sp. nov. and *Brevundimonas staleyi* sp. nov., prosthecate bacteria from aquatic habitats. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60:1837-1843.
- Abraham, W. R., Lünsdorf, H., Vancanneyt, M., & Smit, J. (2013).** Cauliform bacteria lacking phospholipids from an abyssal hydrothermal vent: proposal of *Glycocalis abyssi* gen. nov., sp. nov., belonging to the family Hyphomonadaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:2207-2215.
- Aguilar, P., Acosta, E., Dorador, C., & Sommaruga, R. (2016).** Large differences in bacterial community composition among three nearby extreme waterbodies of the high Andean plateau. *Front Microbiol*, 7:976.
- Albarracín, V. H., Kurth, D., Ordoñez, O. F., Belfiore, C., Luccini, E., Salum, G. M., Piacentini, R. D. & Fariás, M. E. (2015).** High-up: a remote reservoir of microbial extremophiles in central Andean wetlands. *Front Microbiol*, 6:1404.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402.
- Altshuler, I., Goordial, J., & Whyte, L. G. (2017).** Microbial Life in Permafrost. In *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* (pp. 153-179). Springer, Cham.
- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Aguilera, Á., Rodríguez, N., Malki, M., García-Moyano A., Fairén A. G., de la Fuente V. & Sanz, J. L. (2007).** Extreme environments as Mars terrestrial analogs: the Rio Tinto case. *Planet Space Sci* 55:370-381.
- An, D. S., Lee, H. G., Im, W. T., Liu, Q. M., & Lee, S. T. (2007).** *Segetibacter koreensis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the phylum Bacteroidetes, isolated from the soil of a ginseng field in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57:1828-1833.
- Aszalós, J. M., Krett, G., Anda, D., Márialigeti, K., Nagy, B. & Borsodi, A. K. (2016)** Diversity of extremophilic bacteria in the sediment of high-altitude lakes located in the mountain desert of Ojos del Salado volcano, Dry-Andes. *Extremophiles* 20:603-620.
- Azócar GF, Brenning A (2010)** Hydrological and geomorphological significance of rock glaciers in the dry Andes, Chile (27–33 S). *Permafrost Periglacial* 21:42–53
- Badgeley, J. A., Pettit, E. C., Carr, C. G., Tulaczyk, S., Mikucki, J. A. & Lyons, W. B. (2017)** An englacial hydrologic system of brine within a cold glacier: Blood Falls, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *J Glaciol* 63:387-400.

- Bagheri, M., Amoozegar, M. A., Didari, M., Makhdoumi-Kakhki, A., Schumann, P., Spröer, C., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2013).** *Marinobacter persicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a saline lake in Iran. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104:47-54.
- Bahr, M., Hobbie, J. E. & Sogin, M. L. (1996).** Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR11 cluster. *Aquat Microb Ecol*, 11:271-277.
- Bai, Y., Yang, D., Wang, J., Xu, S., Wang, X. & An, L. (2006).** Phylogenetic diversity of culturable bacteria from alpine permafrost in the Tianshan Mountains, northwestern China. *Res Microbiol*, 157:741-751.
- Baker, P. E., González-Ferrán, O. & Rex, D. C. (1987).** Geology and geochemistry of the Ojos del Salado volcanic region, Chile. *J Geol Soc London*, 144:85-96.
- Baker, B. J. & Banfield, J. F. (2003).** Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol*, 44:139-152.
- Baker-Austin, C. & Dopson, M. (2007).** Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol*, 15:165-171.
- Bakermans, C., Tsapin, A. I., Souza-Egipsy, V., Gilichinsky, D. A., & Nealson, K. H. (2003).** Reproduction and metabolism at -10 °C of bacteria isolated from Siberian permafrost. *Environ Microbiol*, 5:321-326.
- Bendia, A. G., Signori, C. N., Franco, D. C., Duarte, R. T., Bohannon, B. J., & Pellizari, V. H. (2018).** A mosaic of geothermal and marine features shapes microbial community structure on deception Island Volcano, Antarctica. *Front Microbiol*, 9.
- Bergmann, G. T., Bates, S. T., Eilers, K. G., Lauber, C. L., Caporaso, J. G., Walters, W. A., Knight R. & Fierer, N. (2011)** The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem* 43:1450-1455.
- Bernardet, J. F. (2011).** Order I. Flavobacteriales ord. nov. p105 In: Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB, (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 4, 2nd ed. Springer, New York, NY.
- Bockheim, J., Vieira, G., Ramos, M., López-Martínez, J., Serrano, E., Guglielmin, M., Wilhelm, K. & Nieuwendam, A. (2013).** Climate warming and permafrost dynamics in the Antarctic Peninsula region. *Global Planet Change*, 100:215-223.
- Boden, R., Hutt, L. P., & Rae, A. W. (2017).** Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the Hydrogenophilales to the Nitrosomonadales, proposal of Hydrogenophilalia class. nov. within the 'Proteobacteria', and four new families within the orders Nitrosomonadales and Rhodocyclales. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67:1191-1205.
- Bondoso, J., Albuquerque, L., Nobre, M. F., Lobo-da-Cunha, A., da Costa, M. S., & Lage, O. M. (2011).** *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a planctomycete isolated from a freshwater aquarium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61:2844-2850.
- Borsodi, A. K., Micsinai, A., Rusznyak, A., Vladar, P., Kovacs, G., Toth, E. M., & Marialigeti, K. (2005).** Diversity of alkaliphilic and alkalitolerant bacteria cultivated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. *Microbial Ecol*, 50: 9-18.

- Bowman, J. P., Nichols, C. M., & Gibson, J. A. (2003).** *Algoriphagus ratkowskyi* gen. nov., sp. nov., *Brumimicrobium glaciale* gen. nov., sp. nov., *Cryomorpha ignava* gen. nov., sp. nov. and *Crocinitomix catalasitica* gen. nov., sp. nov., novel flavobacteria isolated from various polar habitats. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1343-1355.
- Brettar, I., Christen, R., & Höfle, M. G. (2002).** *Rheinheimera baltica* gen. nov., sp. nov., a blue-coloured bacterium isolated from the central Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:1851-1857.
- Brewer, T. E., Handley, K. M., Carini, P., Gilbert, J. A., & Fierer, N. (2017).** Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium ‘Candidatus Udaeobacter copiosus’. *Nat Microbiol*, 2:16198.
- Busse, H. J., Denner, E. B., Buczolits, S., Salkinoja-Salonen, M., Bennisar, A., & Kämpfer, P. (2003).** *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air-and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1253-1260.
- Cabrol N.A., Grin E.A., Chong G., Minkley E., Hock A.N., Yu Y., Bebout L., Fleming E., Häder D.P., Demergasso C., Gibson J., Escudero L., Dorador C., Lim D., Woosley C., Morris R.L., Tambley C., Gaete V., Galvez M.E., Smith E., Uskin-Peate I., Salazar C., Dawidowicz G. & Majerowicz J. (2009a)** The high-lakes project. *J Geophys Res-Biogeophys* 114(G2)
- Cabrol, N. A., McKay, C. P., Grin, E. A., Kiss, K. T., Ács, É., Tóth, B., Grigorszky, I., Szabó, K., Fike, D. A., Hock A. N., Demergasso, C., Escudero, L., Galleguillos, P., Chong, G., Grigsby, B. H., Román, J. Z. & Tambley, C. (2009b).** Signatures of habitats and life in Earth’s high-altitude lakes: clues to Noachian aqueous environments on Mars. In: *The Geology of Mars: Evidence from Earth-Based Analogs*, ed. Mary Chapman. Cambridge University Press.
- Cai, M., Wang, L., Cai, H., Li, Y., Wang, Y. N., Tang, Y. Q. & Wu, X. L. (2011).** *Salinarimonas ramus* sp. nov. and *Tessaracoccus oleiagri* sp. nov., isolated from a crude oil-contaminated saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61:1767-1775.
- Cameron, K. A., Stibal, M., Zarsky, J. D., Gözdereliler, E., Schostag, M. & Jacobsen, C. S. (2015).** Supraglacial bacterial community structures vary across the Greenland ice sheet. *FEMS Microbiol Ecol*, 92:fiv164
- Cary, S. C., McDonald, I. R., Barrett, J. E. & Cowan, D. A. (2010).** On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nat Rev Microbiol*, 8:129.
- Cavicchioli, R. (2002).** Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, 2:281-292.
- Chen, Y. G., Cui, X. L., Zhang, Y. Q., Li, W. J., Wang, Y. X., Xu, L. H., Wen M.L., Peng Q. & Jiang, C. L. (2009).** *Paraliobacillus quinghaiensis* sp. nov., isolated from salt-lake sediment in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59:28-33.
- Chen, Q., Ni, H. Y., Zhuang, W., Sun, Z. G., Yang, Z. Z., Wang, H. M., He, Q. & He, J. (2015).** *Nitratioreductor soli* sp. nov., isolated from phenol-contaminated soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108:1139-1146.
- Cheng, Z., Xiao, L., Wang, H., Yang, H., Li, J., Huang, T., Xu, Y. & Ma, N. (2017).** Bacterial and archaeal lipids recovered from subsurface evaporites of Dalangtan

- Playa on the Tibetan Plateau and their astrobiological implications. *Astrobiology*, 17:1112-1122.
- Chin, K. J., Liesack, W. & Janssen, P. H. (2001).** *Opitutus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division 'Verrucomicrobia' isolated from rice paddy soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51:1965-1968.
- Comte, J., Monier, A., Crevecœur, S., Lovejoy, C. & Vincent, W. F. (2016).** Microbial biogeography of permafrost thaw ponds across the changing northern landscape. *Ecography*, 39:609-618.
- Costello, E. K., Halloy, S. R., Reed, S. C., Sowell, P. & Schmidt, S. K. (2009)** Fumarole-supported islands of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape on Socompa Volcano, Puna de Atacama, Andes. *Appl Environ Microbiol*, 75:735-747.
- Cousins, C. R. & Crawford, I. A. (2011).** Volcano-ice interaction as a microbial habitat on Earth and Mars. *Astrobiology*, 11:695-710.
- Cousins, C. R., Fogel, M., Bowden, R., Crawford, I., Boyce, A., Cockell, C. & Gunn, M. (2018).** Biogeochemical probing of microbial communities in a basalt-hosted hot spring at Kverkfjöll volcano, Iceland. *Geobiology*, 16:507-521.
- Dang, H., Li, T., Chen, M. & Huang, G. (2008).** Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl Environ Microbiol*, 74:52-60.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H. & Kirkegaard, R. H. (2015).** Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528:504.
- Davidov, Y., Friedjung, A. & Jurkevitch, E. (2006).** Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of Bdellovibrio-and-like organisms. *Environ Microbiol*, 8:1667-1673.
- Demergasso, C., Escudero, L., Casamayor, E. O., Chong, G., Balagué, V. & Pedrós-Alió, C. (2008).** Novelty and spatio-temporal heterogeneity in the bacterial diversity of hypersaline Lake Tebenquiche (Salar de Atacama). *Extremophiles*, 12:491-504.
- Demergasso, C., Dorador, C., Meneses, D., Blamey, J., Cabrol, N., Escudero, L. & Chong, G. (2010).** Prokaryotic diversity pattern in high-altitude ecosystems of the Chilean Altiplano. *J Geophys Res: Biogeosciences*, 115(G2).
- Dib, J., Motok, J., Zenoff, V. F., Ordoñez, O. & Farías, M. E. (2008).** Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B, and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high-altitude (above 4400 m) Andean wetlands. *Curr Microbiol*, 56:510-517.
- Dobinski, W. (2011).** Permafrost. *Earth-Science Reviews*, 108:158-169.
- Donahoe-Christiansen, J., D'Imperio, S., Jackson, C. R., Inskip, W. P., & McDermott, T. R. (2004).** Arsenite-oxidizing *Hydrogenobaculum* strain isolated from an acid-sulfate-chloride geothermal spring in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol*, 70:1865-1868.

- Doronina, N. V., Poroshina, M. N., Kaparullina, E. N., Ezhov, V. A. & Trotsenko, Y. A. (2013).** *Methyloligella halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Methyloligella solikamskensis* sp. nov., two nonpigmented halotolerant obligately methylotrophic bacteria isolated from the Ural saline environments. *Syst Appl Microbiol*, 36:148-154.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. & Knight, R. (2011).** UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27:2194-2200.
- Elferink, S. J. O., Akkermans-van Vliet, W. M., Bogte, J. J., & Stams, A. J. (1999).** *Desulfobacca acetoxidans* gen. nov., sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 49:345-350.
- Engel, A. S., Lee, N., Porter, M. L., Stern, L. A., Bennett, P. C. & Wagner, M. (2003).** Filamentous “Epsilonproteobacteria” dominate microbial mats from sulfidic cave springs. *Appl Environ Microbiol*, 69:5503-5511.
- Falagán, C., & Johnson, D. B. (2014).** *Acidibacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic ferric iron-reducing gammaproteobacterium. *Extremophiles*, 18:1067-1073.
- Farías, M. E., Rascovan, N., Toneatti, D. M., Albarracín, V. H., Flores, M. R., Poiré, D. G., Collavino, M., Aguilar O. M., Vazquez, M. P. & Polerecky, L. (2013).** The discovery of stromatolites developing at 3570 m above sea level in a high-altitude volcanic lake Socompa, Argentinean Andes. *PloS one*, 8:e53497.
- Farías, M. E., Contreras, M., Rasuk, M. C., Kurth, D., Flores, M. R., Poire, D. G., Novoa, F. & Visscher, P. T. (2014).** Characterization of bacterial diversity associated with microbial mats, gypsum evaporites and carbonate microbialites in thalassic wetlands: Tebenquiche and La Brava, Salar de Atacama, Chile. *Extremophiles*, 18:311-329.
- Feller, G. & Gerday, C. (2003).** Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Microbiol*, 1:200.
- Fernandez, A. B., Rasuk, M. C., Visscher, P. T., Contreras, M., Novoa, F., Poire, D. G., Patterson, M. M., Ventosa, A. & Farias, M. E. (2016).** Microbial diversity in sediment ecosystems (evaporites domes, microbial mats, and crusts) of hypersaline Laguna Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Front Microbiol*, 7:1284.
- Figuerola, A., Contreras, M., Saavedra, B. & Espoz, C. (2016).** Chilean wetlands: biodiversity, endemism, and conservation challenges. *The Wetland Book: II: Distribution, Description and Conservation*, 1-17.
- Fischer, L., Kääb, A., Huggel, C. & Noetzli, J. (2006).** Geology, glacier retreat and permafrost degradation as controlling factors of slope instabilities in a high-mountain rock wall: the Monte Rosa east face. *Nat Hazard Earth Syst*, 6:761-772.
- Francis, P. W. & McAllister, R. (1986).** Volcanology from space: Using Landsat Thematic Mapper data in the central Andes. *Eos, T-Am Geophys Un*, 67:170-171.
- Fudou, R., Jojima, Y., Iizuka, T. & Yamanaka, S. (2002).** *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *J Gen Appl Microbiol*, 48:109-115.

- Fuerst, J. A., Hawkins, J. A., Holmes, A., Sly, L. I., Moore, C. J. & Stackebrandt, E. (1993).** *Porphyrobacter neustonensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-synthesizing budding bacterium from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 43:125-134.
- Fukuda, W., Chino, Y., Araki, S., Kondo, Y., Imanaka, H., Kanai, T., Atomi, H. & Imanaka, T. (2014).** *Polymorphobacter multimanifer* gen. nov., sp. nov., a polymorphic bacterium isolated from Antarctic white rock. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64:2034-2040.
- Ganzert, L., Bajerski, F., Mangelsdorf, K., Lipski, A. & Wagner, D. (2011)** *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61:979-984.
- García-Fraile, P., Benada, O., Cajthaml, T., Baldrian, P., & Lladó, S. (2016).** *Terracidiphilus gabretensis* gen. nov., sp. nov., an abundant and active forest soil acidobacterium important in organic matter transformation. *Appl Environ Microbiol*, 82:560-569.
- Garreaud, R. D. (2009).** The Andes climate and weather. *Advances in Geosciences*, 22:3-11.
- Gilichinsky, D. A. (2002).** Permafrost model of extraterrestrial habitat. In *Astrobiology* (pp. 125-142). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gilichinsky, D., Vishnivetskaya, T., Petrova, M., Spirina, E., Mamykin, V. & Rivkina, E. (2008).** Bacteria in permafrost. In *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology* (pp. 83-102). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Grote, J., Jost, G., Labrenz, M., Herndl, G. J. & Jürgens, K. (2008).** Epsilonproteobacteria represent the major portion of chemoautotrophic bacteria in sulfidic waters of pelagic redoxclines of the Baltic and Black Seas. *Appl Environ Microbiol*, 74:7546-7551.
- Hallberg, K. B., Hedrich, S., & Johnson, D. B. (2011).** *Acidiferrobacter thiooxydans*, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron- and sulfur-oxidizer of the family Ectothiorhodospiraceae. *Extremophiles*, 15:271-279.
- Halloy, S. (1991).** Islands of life at 6000 m altitude: the environment of the highest autotrophic communities on Earth (Socompa Volcano, Andes). *Arctic Alpine Res*, 23:247-262.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2:95.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. & Ryan, P. D. (2001).** PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*, 4:9.
- Hanert, H. H. (1981).** The genus *Gallionella*. In *The Prokaryotes* (pp. 509-515). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Herbold, C. W., McDonald, I. R. & Cary, S. C. (2014).** Microbial ecology of geothermal habitats in Antarctica. In *Antarctic Terrestrial Microbiology* (pp. 181-215). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J. & Andersson, A. F. (2011).** Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J*, 5:1571.
- Heydarian, A., Mousavi, S. M., Vakilchah, F. & Baniasadi, M. (2018).** Application of a mixed culture of adapted acidophilic bacteria in two-step bioleaching of spent lithium-ion laptop batteries. *J Power Sources*, 378:9-30.
- Hiner EJ (2009)** Technical report on the Laguna Verde Salar Project, 3rd region (43-101) Copiapo. Etna Resources Inc, Chile
- Hiraishi, A., Matsuzawa, Y., Kanbe, T., & Wakao, N. (2000).** *Acidisphaera rubrifaciens* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from acidic environments. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50:1539-1546.
- Holanda, R., Hedrich, S., Nancucneo, I., Oliveira, G., Grail, B. M., & Johnson, D. B. (2016).** Isolation and characterisation of mineral-oxidising “*Acidibacillus*” spp. from mine sites and geothermal environments in different global locations. *Res Microbiol*, 167:613-623.
- Huber, K. J., Geppert, A. M., Groß, U., Luckner, M., Wanner, G., Cooper, P., Abakah, J., Janssen, I. & Overmann, J. (2017).** *Aridibacter nitratreducens* sp. nov., a member of the family Blastocatellaceae, class Blastocatellia, isolated from an African soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(11), 4487-4493.
- Hultman, J., Waldrop, M. P., Mackelprang, R., David, M. M., McFarland, J., Blazewicz, S. J., Harden, J., Turetsky, M. R., McGuire, A. D., Shah, M. B., VerBerkmoes, N. C., Lee, L. H., Mavrommatis, K. & Jansson, J. K. (2015).** Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature*, 521:208.
- Hynek, B. M., Rogers, K. L., Antunovich, M., Avard, G. & Alvarado, G. E. (2018, ahead of print).** Lack of Microbial Diversity in an Extreme Mars Analog Setting: Poás Volcano, Costa Rica. *Astrobiology*. 18:923-933.
- Im, W. T., Hu, Z. Y., Kim, K. H., Rhee, S. K., Meng, H., Lee, S. T. & Quan, Z. X. (2012).** Description of *Fimbriimonas ginsengisoli* gen. nov., sp. nov. within the Fimbriimonadia class nov., of the phylum Armatimonadetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102:307-317.
- Inagaki, F., Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2003).** *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing ϵ -proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1801-1805.
- Inagaki, F., Takai, K., Nealson, K. H. & Horikoshi, K. (2004).** *Sulfurovum lithotrophicum* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the ϵ -Proteobacteria isolated from Okinawa Trough hydrothermal sediments. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1477-1482.
- Ince, I. A., Demirbağ, Z. & Katı, H. (2014)** *Arthrobacter pityocampae* sp. nov., isolated from Thaumetopoea pityocampa (Lep., Thaumetopoeidae). *Int J Syst Evol Microbiol*, 64:3384-3389.
- Jansson, J. K. & Taş, N. (2014).** The microbial ecology of permafrost. *Nat Rev Microbiol*, 12:414.

- Jenkins, O., Byrom, D. & Jones, D. (1987). *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 37:446-448.
- Ji, M., van Dorst, J., Bissett, A., Brown, M. V., Palmer, A. S., Snape, I., Siciliano, S. D. & Ferrari, B. C. (2016). Microbial diversity at Mitchell Peninsula, Eastern Antarctica: a potential biodiversity “hotspot”. *Polar Biol*, 39:237-249.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Liu, X., Li, Y., Ji, S., & Zhang, C. L. (2007). Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. *Environ Microbiol*, 9:2603-2621.
- Jiang, H., Huang, Q., Deng, S., Dong, H., & Yu, B. (2010). Planktonic actinobacterial diversity along a salinity gradient of a river and five lakes on the Tibetan Plateau. *Extremophiles*, 14:367-376.
- Jiang, F., Li, W., Xiao, M., Dai, J., Kan, W., Chen, L., Li, W., Fang, C. & Peng, F. (2012). *Luteolibacter luojiensis* sp. nov., isolated from Arctic tundra soil, and emended description of the genus *Luteolibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62:2259-2263.
- Jogler, M., Chen, H., Simon, J., Rohde, M., Busse, H. J., Klenk, H. P., Tindall, B. J. & Overmann, J. (2013). Description of *Sphingorhabdus planktonica* gen. nov., sp. nov. and reclassification of three related members of the genus *Sphingopyxis* in the genus *Sphingorhabdus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:1342-1349.
- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol*, 27:307-317.
- Johnson, D. B., Bacelar-Nicolau, P., Okibe, N., Thomas, A., & Hallberg, K. B. (2009). *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59:1082-1089.
- Jones, R. M., & Johnson, D. B. (2015). *Acidithrix ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.; a filamentous and obligately heterotrophic, acidophilic member of the Actinobacteria that catalyzes dissimilatory oxido-reduction of iron. *Res Microbiol*, 166:111-120.
- Kalyuzhnaya, M. G., De Marco, P., Bowerman, S., Pacheco, C. C., Lara, J. C., Lidstrom, M. E., & Chistoserdova, L. (2006). *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a novel taxon within the Betaproteobacteria represented by three methylotrophic isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2517-2522.
- Kämpfer, P., Schulze, R., Jäckel, U., Malik, K. A., Amann, R. & Spring, S. (2005). *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55:341-344.
- Kojima, H., Shinohara, A., & Fukui, M. (2015). *Sulfurifustis variabilis* gen. nov., sp. nov., a sulfur oxidizer isolated from a lake, and proposal of Acidiferrobacteraceae fam. nov and Acidiferrobacterales ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65:3709-3713.
- Kozich, J., Westcott, S., Baxter, N., Highlander, S. & Schloss, P. (2013). 16S sequencing with the Illumina MiSeq personal sequencer, p 1–16. University of Michigan Health System standard operating procedure. University of Michigan, Ann Arbor, MI.
- Kulichevskaya, I. S., Kostina, L. A., Valášková, V., Rijpstra, W. I. C., Damsté, J. S. S., de Boer, W., & Dedysh, S. N. (2012). *Acidicapsa borealis* gen. nov., sp. nov.

- and *Acidicapsa ligni* sp. nov., subdivision 1 Acidobacteria from *Sphagnum* peat and decaying wood. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62:1512-1520.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016).** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33:1870-1874.
- Kunin, V., Engelbrektson, A., Ochman, H. & Hugenholtz, P. (2010).** Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol*, 12:118-123.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E and Goodfellow M (ed) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, UK, Wiley, Chichester, 115–148.
- Lara, J., González, L. E., Ferrero, M., Díaz, G. C., Pedrós-Alió, C. & Demergasso, C. (2012).** Enrichment of arsenic transforming and resistant heterotrophic bacteria from sediments of two salt lakes in Northern Chile. *Extremophiles*, 16:523-538.
- Laurion, I., Vincent, W. F., MacIntyre, S., Retamal, L., Dupont, C., Francus, P. & Pienitz, R. (2010).** Variability in greenhouse gas emissions from permafrost thaw ponds. *Limnology and Oceanography*, 55:115-133.
- Laybourn-Parry, J. & Pearce, D. A. (2007).** The biodiversity and ecology of Antarctic lakes: models for evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362:2273-2289.
- Lee, D. W. & Lee, S. D. (2010).** *Marmoricola scoriae* sp. nov., isolated from volcanic ash. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60:2135-2139.
- Lee, S. D. (2015).** *Antricoccus suffusus* gen. nov., sp. nov., isolated from a natural cave. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65:4410-4416.
- Lin, X., McKinley, J., Resch, C. T., Kaluzny, R., Lauber, C. L., Fredrickson, J. & Konopka, A. (2012).** Spatial and temporal dynamics of the microbial community in the Hanford unconfined aquifer. *ISME J*, 6:1665.
- Liu, Y., Yao, T., Jiao, N., Kang, S., Zeng, Y. & Huang, S. (2006).** Microbial community structure in moraine lakes and glacial meltwaters, Mount Everest. *FEMS Microbiol Let*, 265:98-105.
- Liu, J., Wang, S., Yu, S., Yang, D. & Zhang, L. (2009a).** Climate warming and growth of high-elevation inland lakes on the Tibetan Plateau. *Global Planet Change*, 67:209-217.
- Liu, Y., Yao, T., Jiao, N., Kang, S., Huang, S., Li, Q., Wang, K. & Liu, X. (2009b).** Culturable bacteria in glacial meltwater at 6,350 m on the East Rongbuk Glacier, Mount Everest. *Extremophiles*, 13:89-99.
- Liu, Y., Yao, T., Jiao, N., Zhu, L., Hu, A., Liu, X., Gao, J. & Chen, Z. Q. (2013).** Salinity impact on bacterial community composition in five high-altitude lakes from the Tibetan Plateau, Western China. *Geomicrobiol J*, 30:462-469.
- Lynch, R. C., King, A. J., Farías, M. E., Sowell, P., Vitry, C. & Schmidt, S. K. (2012).** The potential for microbial life in the highest-elevation (> 6000 masl) mineral soils of the Atacama region. *J Geophys Res-Biogeophys*, 117(G2).

- Lyu, Y., Zheng, W., Zheng, T. & Tian, Y. (2014).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *PloS one*, 9:e101438.
- Mackelprang, R., Waldrop, M. P., DeAngelis, K. M., David, M. M., Chavarria, K. L., Blazewicz, S. J., Rubin E. M. & Jansson, J. K. (2011).** Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature*, 480:368.
- Macur, R.E., Langner, H. W., Kocar, B. D. & Inskeep, W. P. (2004).** Linking geochemical processes with microbial community analysis: successional dynamics in an arsenic-rich, acid-sulphate-chloride geothermal spring. *Geobiology*, 2:163-177.
- Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Daffonchio, D., Donachie, S. & Borin, S. (2015).** Microbial life in volcanic lakes. In *Volcanic Lakes* (pp. 507-522). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Margesi, R. & Miteva, V. (2011).** Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol*, 162:346-361.
- Margesi, R. & Schinner, F. (1994).** Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *J Biotechnol*, 33:1-14.
- Mari, L., Nagy, B., Heiling, Zs. & Nemerkenyi, Zs. (2014)** Pszeudokarszt a Száraz-Andokban? – Az Ojos del Salado olvadáshoz köthető felszinformái. *Karsztfelődés* XIX. Szombathely, 2014. pp.231-241
- Martínez-Cánovas, M. J., Bejar, V., Martínez-Checa, F., Paez, R. & Quesada, E. (2004).** *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1793-1797.
- Maturrano, L., Santos, F., Rosselló-Mora, R. & Antón, J. (2006).** Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes. *Appl Environ Microbiol*, 72:3887-3895.
- Mohagheghi, A., Grohmann, K. M. M. H., Himmel, M., Leighton, L., & Updegraff, D. M. (1986).** Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*, 36:435-443.
- Montes, M. J., Bozal, N. & Mercade, E. (2008).** *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58:1346-1349.
- Moreira, D., & Amils, R. (1997).** Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 47(2), 522-528.
- Morita, R. Y. (1975).** Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, 39:144.
- Morris, B. E., Henneberger, R., Huber, H. & Moissl-Eichinger, C. (2013).** Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiol Rev*, 37:384-406.
- Moussard, H., Corre, E., Cambon-Bonavita, M. A., Fouquet, Y. & Jeanthon, C. (2006).** Novel uncultured Epsilonproteobacteria dominate a filamentous sulphur mat from the 13 N hydrothermal vent field, East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol*, 58:449-463.

- Muñoz, P. A., Flores, P. A., Boehmwald, F. A. & Blamey, J. M. (2011).** Thermophilic bacteria present in a sample from Fumarole Bay, Deception Island. *Antarct Sci*, 23:549-555.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59:695-700.
- Nagy, B., Mari, L., Kovács, J., Nemerkenyi, Z. & Heiling, Z. (2014a).** Az Ojos del Salado monitoring vizsgálata: jég-és vízjelenlét a Föld legszárazabb magashegységében. In.: VII. Magyar Földrajzi Konferencia. Miskolc: Miskolci Egyetem Műszaki Földtudományi Kar, 2014. Konferencia helye, ideje: Miskolc-Lillafüred, Magyarország, 2014.09.02.-2014.09.04. (ISBN 978-963-358-063-9)
- Nagy, B., Ignéczi, Á., Kovács, J., Szalai, Z. & Mari, L. (2018).** Shallow ground temperature measurements on the highest volcano on Earth, Mt. Ojos del Salado, Arid Andes, Chile. *Permafrost Periglac*, 30:3-18.
- Nagy B., Mari L., Kovács J., Nemerkenyi Zs. & Heiling Zs., (2014b)** Környezetváltozás a Száraz-Andokban: az Ojos del Salado monitoring vizsgálata (In Hungarian). In: Cserny T, KovácsPálffy P, Krivánné Horváth Á (szerk.) HUNGEO 2014 Magyar Földtudományi szakemberek XII. találkozója: Magyar felfedezők és kutatók a természeti erőforrások hasznosításáért: cikkgyűjtemény. Budapest: Magyarhoni Földtani Társulat, pp 53–62 (ISBN:978-963-8221-53-7)
- Navarro-González, R., Rainey, F. A., Molina, P., Badgaley, D. R., Hollen, B. J., de la Rosa, J., Small A. M., Quinn, R. C., Grunthaner, F.J., Cáceres, L., Gomez-Silva, B. & McKay, C. P. (2003).** Mars-like soils in the Atacama Desert, Chile, and the dry limit of microbial life. *Science*, 302:1018-1021.
- Nelson, W. C. & Stegen, J. C. (2015).** The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Front Microbiol*, 6:713.
- Norris, P. R., Clark, D. A., Owen, J. P., & Waterhouse, S. (1996).** Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology*, 142:775-783.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. (1997).** PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 63:3327-3332.
- Ordoñez, O. F., Flores, M. R., Dib, J. R., Paz, A. & Farías, M. E. (2009).** Extremophile culture collection from Andean lakes: extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation. *Microbial Ecol*, 58:461-473.
- Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biot*, 28:56-63.
- Oren, A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline systems*, 4:2.
- Oren, A. (2010).** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol*, 31:825-834.
- Oren, A. (2014).** The family Rhodocyclaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 975-998). Springer, Berlin, Heidelberg.

- O'Sullivan, L. A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2005).** *Fluviicola taffensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family Cryomorphaceae in the phylum 'Bacteroidetes'. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55:2189-2194.
- Perkerson III, R. B., Johansen, J. R., Kovácik, L., Brand, J., Kaštovský, J. & Casamatta, D. A. (2011).** A unique Pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *J Phycol*, 47:1397-1412.
- Prieto-Ballesteros, O., Fernandez-Remolar, D. C., Gómez, F., Torres, J., Gómez Ortiz, D., Kargel, J. S., González-Pastor, E., Sampedro, M. F., Martín-Redondo, M. P., de Figueras, C. G. & Gómez-Elvira, J. (2006, March).** The Permafrost in the Imuruk Lake Basaltic Field (Alaska) as a Martian Permafrost Analogue. In *37th Annual Lunar and Planetary Science Conference* (Vol. 37).
- Qiu, X., Qu, Z., Jiang, F., Ren, L., Chang, X., Kan, W., Fang C. & Peng, F. (2014).** *Pedobacter huanghensis* sp. nov. and *Pedobacter glacialis* sp. nov., isolated from Arctic glacier foreland. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(7), 2431-2436.
- Qiu, X., Qu, Z., Jiang, F., Lin, Y., Zhang, Y., Chang, X., Da X., Deng, S., Kim M., Fang C. & Peng, F. (2016).** *Roseomonas arctica* sp. nov., isolated from arctic glacial foreland soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66:1218-1223.
- Quan, Z. X., Im, W. T., & Lee, S. T. (2006).** *Azonexus caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56:1043-1046.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2012).** The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41:D590-D596.
- Rainey, F. A., Zhilina, T. N., Boulygina, E. S., Stackebrandt, E., Tourova, T. P., & Zavarzin, G. A. (1995).** The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of Haloanaerobiales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level. *Anaerobe*, 1:185.
- Rasuk, M. C., Kurth, D., Flores, M. R., Contreras, M., Novoa, F., Poire, D. & Farias, M. E. (2014).** Microbial characterization of microbial ecosystems associated to evaporites domes of gypsum in Salar de Llamara in Atacama desert. *Microbial Ecol*, 68:483-494.
- Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M. L., Patel, B. K., Thomas, P., Garcia, J. L., & Ollivier, B. (1999).** *Fusibacter paucivorans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thiosulfate-reducing bacterium from an oil-producing well. *Int J Syst Evol Microbiol*, 49:1141-1147.
- Reddy, G. S., Aggarwal, R. K., Matsumoto, G. I. & Shivaji, S. (2000)** *Arthrobacter flavus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from a pond, in McMurdo Dry Valley, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1553-1561.
- Rundel, P. W. & Kleier, C. C. (2014).** Parque Nacional Nevado de Tres Cruces, Chile: A Significant Coldspot of Biodiversity in a High Andean Ecosystem. *Mountain views*, 2.

- Saha, P., & Chakrabarti, T. (2006).** *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56:1905-1909.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406-425.
- Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., Amils, R. & Sanz, J. L. (2011).** Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microbiol*, 77:6085-6093.
- Sánchez-Andrea, I., Knittel, K., Amann, R., Amils, R. & Sanz, J. L. (2012)** Quantification of Tinto River sediment microbial communities: the importance of sulfate-reducing bacteria and their role in attenuating acid mine drainage. *Appl Environ Microbiol* AEM-00848.
- SantaCruz-Calvo, L., González-López, J. & Manzanera, M. (2013)** *Arthrobacter siccitolerans* sp. nov., a highly desiccation-tolerant, xeroprotectant-producing strain isolated from dry soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:4174-4180.
- Schleheck, D., Tindall, B. J., Rossello-Mora, R., & Cook, A. M. (2004).** *Parvibaculum lavamentivorans* gen. nov., sp. nov., a novel heterotroph that initiates catabolism of linear alkylbenzenesulfonate. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1489-1497.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski R.A., Oakley, B.B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, d. J. & Weber, C. F. (2009).** Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75:7537-7541.
- Schloss, P. D., Gevers, D., & Westcott, S. L. (2011).** Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PloS one*, 6:e27310.
- Schmidt, S. K., Nemergut, D. R., Miller, A. E., Freeman, K. R., King, A. J., & Seimon, A. (2009).** Microbial activity and diversity during extreme freeze–thaw cycles in periglacial soils, 5400 m elevation, Cordillera Vilcanota, Perú. *Extremophiles*, 13:807-816.
- Schmidt, S. K., Gendron, E. M. S., Vincent, K., Solon, A. J., Sommers, P., Schubert, Z. R., Vimercati, L., Porazinska, D.L., Darcy, J.L. & Sowell, P. (2018)** Life at extreme elevations on Atacama volcanoes: the closest thing to Mars on Earth? *Antonie van Leeuwenhoek* 1-13.
- Shaoling, W., Huijun, J., Shuxun, L. & Lin, Z. (2000).** Permafrost degradation on the Qinghai–Tibet Plateau and its environmental impacts. *Permafrost Periglac*, 11:43-53.
- Sharma, A., Parashar, D. & Satyanarayana, T. (2016).** Acidophilic microbes: biology and applications. In *Biotechnology of Extremophiles*: (pp. 215-241). Springer, Cham.
- Shen, L., Liu, Y., Gu, Z., Xu, B., Wang, N., Jiao, N., Liu, H. & Zhou, Y. (2015).** *Massilia eurypsychrophila* sp. nov. a facultatively psychrophilic bacteria isolated from ice core. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65:2124-2129.

- Siddiqi, M. Z., Kim, Y. J., Hoang, V. A., Siddiqi, M. H., Huq, M. A. & Yang, D. C. (2014) *Arthrobacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Arch Microbiol* 196:863-870
- Singleton, D. R., Adrion, A. C. & Aitken, M. D. (2016). Surfactant-induced bacterial community changes correlated with increased polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in contaminated soil. *Appl Microbiol Biot*, 100:10165-10177.
- Smellie, J. L. & Edwards, B. R. (2016). Glaciovolcanism on Earth and Mars. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139764384>
- Solon, A. J., Vimercati, L., Darcy, J. L., Arán, P., Porazinska, D., Dorador, C., Farías, M. E & Schmidt, S. K. (2018) Microbial Communities of High-Elevation Fumaroles, Penitentes, and Dry Tephra “Soils” of the Puna de Atacama Volcanic Zone. *Microb Ecol* 1-12.
- Soo, R. M., Wood, S. A., Grzymiski, J. J., McDonald, I. R. & Cary, S. C. (2009). Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 11:715-728.
- Squeo, F. A., Warner, B., Aravena, R. & Espinoza, D. (2006). Bofedales: high altitude peatlands of the central Andes. *Revista Chilena de Historia Natural* 79:245-255
- Squyres, S. W., Wilhelms, D. E. & Moosman, A. C. (1987) Large-scale volcano-ground ice interactions on Mars. *Icarus* 70:385-408.
- Sorokina, A. Y., Chernousova, E. Y. & Dubinina, G. A. (2012). *Ferrovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel neutrophilic facultative anaerobic Fe (II)-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Let*, 335:19-25.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 44:846-849.
- Steven, B., Leveille, R., Pollard, W. H. & Whyte, L. G. (2006). Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles*, 10:259-267
- Steven, B., Briggs, G., McKay, C. P., Pollard, W. H., Greer, C. W. & Whyte, L. G. (2007). Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 59:513-523.
- Stohr, R., Waberski, A., Völker, H., Tindall, B. J., & Thomm, M. (2001). *Hydrogenothermus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, recognition of *Calderobacterium hydrogenophilum* as a member of the genus *Hydrogenobacter* and proposal of the reclassification of *Hydrogenobacter acidophilus* as *Hydrogenobaculum acidophilum* gen. nov., comb. nov., in the phylum 'Hydrogenobacter/Aquifex'. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1853-1862.
- Szuróczki, S., Kéki, Z., Káli, S., Lippai, A., Márialigeti, K., & Tóth, E. (2016). Microbiological investigations on the water of a thermal bath at Budapest. *Acta Microbiol Hung*, 63:229-241.
- Tahon, G., Tytgat, B., Lebbe, L., Carlier, A. & Willems, A. (2018). *Abditibacterium utsteinense* sp. nov., the first cultivated member of candidate phylum FBP, isolated from ice-free Antarctic soil samples. *Syst Appl Microbiol* 41:279-290.

- Tebo, B. M., Davis, R. E., Anitori, R. P., Connell, L. B., Schiffman, P. & Staudigel, H. (2015)** Microbial communities in dark oligotrophic volcanic ice cave ecosystems of Mt. Erebus, Antarctica. *Front Microbiol* 6:179.
- Thevenieau, F., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Joulian, C., & Baena, S. (2007).** *Desulfomicrobium thermophilum* sp. nov., a novel thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Colombia. *Extremophiles*, 11:295-303.
- Tindall, B. J., Rosselló-Mora, R., Busse, H. J., Ludwig, W. & Kämpfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60:249-266.
- Toneatti, D. M., Albarracín, V. H., Flores, M. R., Polerecky, L. & Farías, M. E. (2017).** Stratified Bacterial Diversity along Physico-chemical Gradients in High-Altitude Modern Stromatolites. *Front Microbiol*, 8:646.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake, R., Eisen J. A. & Holmes, D. S. (2008).** *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC genomics*, 9:597.
- Van Den Burg, B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol*, 6:213-218.
- Van Trappen, S., Vandecandelaere, I., Mergaert, J. & Swings, J. (2005).** *Flavobacterium fryxellicola* sp. nov. and *Flavobacterium psychrolimnae* sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55:769-772.
- Vincent, W. F., MacIntyre, S., Retamal, L., Dupont, C., Francus, P. & Pienitz, R. (2010).** Variability in greenhouse gas emissions from permafrost thaw ponds. *Limnol Oceanogr*, 55:115-133.
- Vishnivetskaya, T. A., Petrova, M. A., Urbance, J., Ponder, M., Moyer, C. L., Gilichinsky, D. A. & Tiedje, J. M. (2006).** Bacterial community in ancient Siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods. *Astrobiology*, 6:400-414.
- Vuille, M. & Ammann, C. (1997).** Regional snowfall patterns in the high, arid Andes. *Climatic Change*, 36:413-423.
- Watanabe, T., Kojima, H., & Fukui, M. (2016).** *Sulfuriferula thiophila* sp nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium, and correction of the name *Sulfuriferula plumbophilus* Watanabe, Kojima and Fukui 2015 to *Sulfuriferula plumbiphila* corrig. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66:2041-2045.
- Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., & Sly, L. I. (1999).** Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 49:567-576.
- Wichlacz, P. L., Unz, R. F. & Langworthy, T. A. (1986).** *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium facilis* sp. nov., and *Acidiphilium rubrum* sp. nov.: acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int J Syst Evol Microbiol*, 36:197-201.

- Wilhelm, R. C., Niederberger, T. D., Greer, C. & Whyte, L. G. (2011). Microbial diversity of active layer and permafrost in an acidic wetland from the Canadian High Arctic. *Can J Microbiol*, 57:303-315.
- Willems, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Jantzen, E., Hoste, B., Gillis, M., Kersters, K., Auling, G. & De Ley, J. (1989). *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 39:319-333.
- Wisotzkey, J. D., Jurtshuk JR, P., Fox, G. E., Deinhard, G., & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 42:263-269.
- Wu, Q. L., Zwart, G., Schauer, M., Kamst-van Agterveld, M. P. & Hahn, M. W. (2006). Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Appl Environ Microbiol*, 72:5478-5485.
- Xing, P., Hahn, M. W. & Wu, Q. L. (2009). Low taxon richness of bacterioplankton in high-altitude lakes of the eastern tibetan plateau, with a predominance of Bacteroidetes and *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol*, 75:7017-7025.
- Xiong, J., Liu, Y., Lin, X., Zhang, H., Zeng, J., Hou, J., Yang Y., Yao, T., Knight, R. & Chu, H. (2012). Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau. *Environ Microbiol*, 14:2457-2466.
- Yang, Z. P., Ou, Y. H., Xu, X. L., Zhao, L., Song, M. H. & Zhou, C. P. (2010). Effects of permafrost degradation on ecosystems. *Acta Ecologica Sinica*, 30:33-39.
- Yang, J., Ma, L. A., Jiang, H., Wu, G. & Dong, H. (2016). Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Sci Rep Uk*, 6:25078.
- Yoon, J. H., Lee, K. C., Kho, Y. H., Kang, K. H., Kim, C. J. & Park, Y. H. (2002). *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:123-130.
- Yoon, J., Matsuo, Y., Adachi, K., Nozawa, M., Matsuda, S., Kasai, H. & Yokota, A. (2008). Description of *Persicirhabdus sediminis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ishigakijimensis* gen. nov., sp. nov., *Roseibacillus ponti* sp. nov., *Roseibacillus persicicus* sp. nov., *Luteolibacter pohnpeiensis* gen. nov., sp. nov. and *Luteolibacter algae* sp. nov., six marine members of the phylum ‘Verrucomicrobia’, and emended descriptions of the class Verrucomicrobiae, the order Verrucomicrobiales and the family Verrucomicrobiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58:998-1007.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Jung, Y. T., & Oh, T. K. (2009). *Psychroflexus salinarum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59:2404-2407.
- Zhang, D. C., Wang, H. X., Cui, H. L., Yang, Y., Liu, H. C., Dong, X. Z. & Zhou, P. J. (2007a). *Cryobacterium psychrotolerans* sp. nov., a novel psychrotolerant

- bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57:866-869.
- Zhang, G., Ma, X., Niu, F., Dong, M., Feng, H., An, L. & Cheng, G. (2007b)** Diversity and distribution of alkaliphilic psychrotolerant bacteria in the Qinghai–Tibet Plateau permafrost region. *Extremophiles* 11:415-424.
- Zhang, J., Yang, Y., Zhao, L., Li, Y., Xie, S. & Liu, Y. (2015).** Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99:3291-3302.
- Zhong, Z. P., Liu, Y., Liu, H. C., Wang, F., Zhou, Y. G. & Liu, Z. P. (2015).** *Marinobacter halophilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65:2838-2845
- Ziegler, S., Waidner, B., Itoh, T., Schumann, P., Spring, S., & Gescher, J. (2013).** *Metallibacterium scheffleri* gen. nov., sp. nov., an alkalinizing gammaproteobacterium isolated from an acidic biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:1499-1504.

10 Ábrajegyzék

1. Az Ojos del Salado látképe a Puna de Atacama-fennsíkról	8
2. A Ramsari Egyezmény hatálya alá tartozó sós tavak, a Laguna Santa Rosa és a Laguna del Negro Francisco	11
3. Az Ojos del Salado vulkánon 5900 m tszf magasságban található olvadéktó és környezete.....	13
4. A Föld legmagasabban fekvő tómedencéje.....	15
5. Az Ojos del Salado helyzete Chile térképén, a Laguna Santa Rosa és a Laguna Verde elhelyezkedése a Puna de Atacama-fennsíkon, a Laguna Santa Rosa és a Laguna Verde.....	30
6. A vizsgált permafroszt degradációval keletkező tó, háttérben az Ojos del Salado.	31
7. Az Ojos del Salado mellékkráterének látképe a kráter pereméről és a mintavételi helyek a krátertó környezetében.....	32
8. A Laguna Santa Rosa üledékéből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai.....	46
9. A Laguna Verde melegvizes medencéjének mikrobiális bevonatából tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai.....	47
10. A Laguna Santa Rosa üledékéből származó baktériumtörzsek NaCl tolerancia eredményei.....	48
11. A Laguna Verde bevonatából származó baktériumtörzsek NaCl tolerancia eredményei.....	49
12. A Laguna Santa Rosa üledék- és a Laguna Verde bevonat- és vízmintáira jellemző DGGE molekuláris ujjlenyomatok alapján szerkesztett UPGMA hasonlósági dendrogram.....	51
13. Az Ion Torrent szekvenálás során kimutatott OTU-k (97%) megoszlása a Laguna Santa Rosa üledéke valamint a Laguna Verde vize és bevonata között.....	53
14. A Laguna Santa Rosa és Laguna Verde baktériumközösségeinek szerkezete közötti összefüggés ábrázolása főkomponensek mentén, valamint a közösségszerkezetek közötti különbségekre legnagyobb befolyással bíró filogenetikai törzsek korrelációja	54
15. A Laguna Santa Rosa üledékére és a Laguna Verde bevonatára jellemző baktériumközösségek IonTorrent újgenerációs szekvenálással feltárt diverzitása.	55
16. Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetéből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai.....	64
17. Az Ojos del Salado olvadéktavából származó baktériumtörzsek pH toleranciája.....	66
18. Az Ojos del Salado olvadéktavának üledék- és vízmintáira jellemző baktériumközösségek DGGE molekuláris ujjlenyomatainak UPGMA hasonlósági dendrogramja	67
19. Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetéből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek összehasonlítása Bray-Curtis hasonlóságon alapuló UPGMA dendrogramon és a szekvenciák megoszlása a filogenetikai törzsek között.....	69
20. Az Ojos del Salado olvadéktavának környezetéből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek összehasonlítása főkomponens analízissel.....	71
21. Az Ojos del Salado 5900 m tszf fekvő olvadéktavának környezetéből újgenerációs szekvenálással detektált filogenetikai törzsek megoszlása a vizsgált mintatípusok között	72
22. Az Ojos del Salado krátertavának üledékéből tenyésztésbe vont baktériumtörzsek és az ncbi adatbázisban legnagyobb egyezést mutató találatok neighbor-joining fán ábrázolt filogenetikai viszonyai.....	80
23. Az Ojos del Salado krátertavából származó baktériumtörzsek pH toleranciája	82
24. Az Ojos del Salado kráteréből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek összehasonlítása Bray-Curtis hasonlóságon alapuló UPGMA dendrogramon és a szekvenciák megoszlása a filogenetikai törzsek között	83

25. Az Ojos del Salado kráterének környezeteiből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségeinek összetétele.....	84
26. A Laguna Santa Rosa sós tó üledékében található baktériumközösség taxondiverzitás alapján feltételezhető részvétele a biogeokémiai folyamatokban.....	93
27. A Laguna Verde sós tó biofilmjében található baktériumközösség taxondiverzitás alapján feltételezhető részvétele a biogeokémiai folyamatokban.....	94
28. Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékében található baktériumközösség taxondiverzitás alapján feltételezhető részvétele a biogeokémiai folyamatokban	95
29. Az Ojos del Salado kráterében található fumarolás patak baktériumközösségeinek taxondiverzitás alapján feltételezhető részvétele a biogeokémiai folyamatokban	96

11 Táblázatjegyzék

1. Az Ojos del Salado vizes élőhelyeiről származó minták jellemzői és a vizsgálatok módjának összegzése	34
2. A tenyésztés körülményei az egyes minták esetében.....	35
3. A DGGE során használt poliakrilamid gél összetétele	40
4. A Puna de Atacama-fennsík sós tavainak vízkémiai paraméterei.....	44
5. A Laguna Santa Rosa és Laguna Verde sós tavak üledékéből és bevonatából végzett tenyésztés során kapott becsült telepkepző egységek száma az alkalmazott táptalajok esetében.....	45
6. A Laguna Santa Rosa és Laguna Verde tavakból származó mintákból újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek főbb adatai és diverzitás indexei.....	52
7. Az Ojos del Salado vulkánon 5900 m tszf magasságon fekvő olvadéktó vizének fizikai és kémiai paraméterei	62
8. Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékében található baktériumközösségek R2A és PYG táptalajon meghatározott becsült csíraszám.....	63
9. Az Ojos del Salado olvadéktavának üledékéből és vizéből újgenerációs szekvenálással feltárt baktériumközösségek legfontosabb paraméterei és diverzitás indexei.....	68
10. Az Ojos del Salado vulkánon 6480 m tszf magsságban található krátertó és fumarolás patak vizének kémiai paraméterei.....	79
11. Az Ojos del Salado kráteréből származó minták újgenerációs DNS szekvenálással feltárt baktériumközösségeinek legfontosabb paraméterei és diverzitásindexei.....	83

12 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani azoknak az embereknek, akik nélkül a dolgozat nem készülhetett volna el:

Dr. Borsodi Andreának, témavezetőmnek, aki lehetővé tette, hogy egy ilyen izgalmas témában végezzem doktori kutatásom. Köszönettel tartozom azért, hogy bevezetett az extremofil baktériumok vizsgálatának rejtelmeibe, szakmai jótanácsokkal látott el és folyamatos támogatással kísérte munkám. Sokat tanulhattam Tőle.

Dr. Nagy Balásznak a mintavételért, és hogy az elmúlt években fotókkal, térképekkel, szakmai lektorálással segített, és támogatott abban, hogy magam is megtapasztaljam az Ojos del Salado környezetében uralkodó körülményeket.

Dr. Szabó Attilának az újgenerációs szekvenálásban és a bioinformatikai adatértékelésben nyújtott segítségével;

Dr. Felföldi Tamásnak a szekvenálások során nyújtott segítségével;

Dr. Jurecska Laurának, aki a vízkémiai méréseket végezte;

Dr. Erdei Annának és **Dr. Török Jánosnak**, hogy lehetővé tették számomra az Állatökológia, Zootaxonómia és Hidrobiológia doktori programban való részvételt;

Dr. Márialigeti Károlynak és **Dr. Tóth Erikának**, akik lehetővé tették, hogy az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén végezzem kutatásom.

Köszönöm az **ELTE Mikrobiológiai Tanszék** munkatársainak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért, különösen **Dr. Krett Gergelynek**, **Anda Dórának** és **Megyes Melindának** a közös munkát és a remek társaságot.

Köszönettel tartozom a **Magyar Száraz-Andok Kutatási program** résztvevőinek, akik munkájukkal hozzájárultak a dolgozat megvalósulásához.

De elsősorban **Családomnak** és **Barátaimnak** vagyok hálás, köszönöm Nekik az elmúlt évek során mutatott végtelen lelkesedést, türelmet, megértést, érdeklődést és a sok biztatást.

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Aszalós Júlia Margit

MTMT-azonosító: 10053138

A doktori értekezés címe és alcíme: Az Ojos del Salado vulkán környéki magashegyi vizes élőhelyek extrémofil baktériumközösségei

DOI-azonosító46: 10.15476/ELTE.2019.107

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Zootaxonómiai, állatökológia és hidrobiológia

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr Borsodi Andrea, habilitált egyetemi docens

A témavezető munkahelye: ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

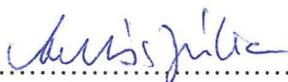
2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019. 06. 24.

.....


a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet